

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIAN SCHADE

O PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA PSORÍASE

CURITIBA

2022

LILIAN SCHADE

O PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA PSORÍASE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de  
Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à conclusão do curso  
de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Valderilio Feijó Azevedo

CURITIBA

2022

S292 Schade, Lilian  
O perfil da microbiota intestinal na psoríase [recurso eletrônico]  
/ Lilian Schade. – Curitiba, 2022.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências  
da Saúde. Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Valderilio Feijó Azevedo

1. Microbioma gastrointestinal. 2. Disbiose. 3. Akkermansia.  
4. Psoríase. 5. Artrite psoriásica. 6. Doenças inflamatórias intesti-  
nais. I. Azevedo, Valderílio Feijó. II. Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da  
Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: QW 100

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LILIAN SCHADE** intitulada: "**O PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA PSORÍASE.**", sob orientação do Prof. Dr. VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

23/02/2022 09:36:47.0

VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/02/2022 12:43:34.0

BETINA WERNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/02/2022 11:44:56.0

SUELI COELHO DA SILVA CARNEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica

23/02/2022 06:39:48.0

DANY ALBERTO MESA FIAGÁ

Avaliador Externo (PPG EM CIÊNCIAS BIOQUÍMICA - UFPR)

Assinatura Eletrônica

18/02/2022 15:30:12.0

EMILTON LIMA JUNIOR

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Há certamente muito a agradecer. Agradeço primeiramente ao meu orientador Valderílio Feijó Azevedo por seu otimismo e competência. Obrigada pelo apoio na extensa busca por um projeto de pesquisa, direcionando-me finalmente ao tema que se tornou foco da presente tese; por estabelecer parcerias que possibilitaram a realização deste trabalho e pela orientação para o desenvolvimento do mesmo.

Agradeço à Edumed por proporcionar a estrutura necessária para a realização do projeto. Obrigada à toda a equipe da Edumed pelo apoio, em especial à Nelci Schramm, secretária e amiga nos diversos desafios que enfrentamos com os agendamentos clínicos e dinâmica das amostras.

Agradeço ao acolhimento e apoio do Serviço de Dermatologia do HC-UFPR, aos seus médicos, residentes, funcionários, ao chefe do Ambulatório de Psoríase Dr Jesus Rodriguez Santamaria e à chefe do Serviço de Dermatologia Dra Fabiane Mulinari Brenner, fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada também à Dermatologista Adriane Reichert Faria, do Serviço de Dermatologia da Santa Casa, pelos seus conhecimentos aplicados a esse trabalho e seu apoio.

Agradeço à GoGenetic ao seu diretor executivo e pesquisador Eduardo Balsanelli, pela excelência no sequenciamento das amostras e pelos esclarecimentos de todo o processo de análise.

Obrigada ao pesquisador Dany Alberto Mesa Fiagá pelas contribuições para o desenvolvimento do projeto e pelo excelente trabalho de bioinformática e análise estatística, sem a sua parceria esse trabalho não alcançaria seus objetivos.

Obrigada aos alunos de Iniciação Científica da UFPR pelo auxílio com a revisão dos muitos prontuários médicos e pela busca telefônica dos pacientes.

Agradeço imensamente à Sociedade Brasileira de Reumatologia pelo incentivo à pesquisa através do apoio financeiro deste trabalho.

Agradeço aos pacientes que participaram deste projeto, esse trabalho é dedicado a vocês. Que o conhecimento produzido nesta pesquisa se reflita em

avanços futuros na psoríase, seu tratamento e qualidade de vida. Da mesma forma, obrigada a todos os voluntários que participaram como grupo controle, sua disposição foi de valor inestimável.

Agradeço a meus pais Wilson Schade e Eliza Maria Schade, ao meu irmão Jackson Schade e a minha cunhada Michele Ferraz da Silva Schade, por todo o empenho para me ajudar nos momentos mais complicados e difíceis, sempre com palavras de carinho e ânimo. Amo vocês família.

Agradeço mais que tudo a Deus, primeiramente pela vida, por uma vida com propósitos, pela graça de conseguirmos desenvolvê-los e pela força para não desistir diante das dificuldades. A Sua presença é real e coloca sentido em tudo o que fazemos.

“Dificuldades preparam pessoas comuns  
para destinos extraordinários.”

C. S. Lewis

## RESUMO

A patogênese da psoríase, uma doença inflamatória crônica cutânea imunomediada, permanece desconhecida. Estudos mostram a associação entre psoríase e inflamação intestinal, neste contexto, a influência da microbiota intestinal na resposta imune da psoríase tornou-se foco de pesquisas recentes. O presente estudo avaliou a composição e a diversidade da microbiota intestinal de 21 participantes com psoríase de um serviço brasileiro de referência em Dermatologia em comparação com 24 controles saudáveis. Uma amostra de fezes foi coletada de cada participante no momento da inclusão no estudo e as amostras foram analisadas por sequenciamento do gene 16S rRNA. O recrutamento dos participantes da pesquisa envolveu o emparelhamento entre os grupos por gênero, idade, índice de massa corporal, comorbidades e tabagismo; e a exclusão de diversos critérios que poderiam influenciar a microbiota intestinal e a interpretação dos dados. Houve aumento do gênero *Dialister* ( $p = 0,006$ ) e da espécie *Prevotella copri* ( $p = 0,007$ ) em pacientes com psoríase em relação ao grupo controle. Uma redução nos gêneros *Ruminococcus* ( $p = 0,037$ ), *Lachnospira* ( $p = 0,002$ ) e *Blautia* ( $p = 0,028$ ), bem como nas espécies *Akkermansia muciniphila* ( $p = 0,035$ ), também foi verificada no grupo psoríase em relação ao grupo controle. Além disso, os pacientes com psoríase exibiram menos diversidade da microbiota intestinal do que os controles.

**Palavras-chave:** Microbioma intestinal, Disbiose, *Akkermansia muciniphila*, Psoríase, Artrite Psoriásica, Doença intestinal inflamatória.

## ABSTRACT

The pathogenesis of psoriasis, an immune-mediated chronic inflammatory skin disease, remains unclear. Studies have shown an association between psoriasis and intestinal inflammation; in this context, the influence of the gut microbiota on the immune response of psoriasis has become a focus of recent research. The present research evaluated the composition and diversity of the gut microbiota of 21 participants with psoriasis from a Brazilian referral dermatology service compared to 24 healthy controls. A stool sample was collected from each participant at the time of inclusion in the study and the samples were analyzed by sequencing the 16S rRNA gene. The recruitment of research participants involved matching between groups by sex, age, body mass index, comorbidities and smoking and the exclusion of several criteria that could potentially influence the gut microbiota and the interpretation of the data. There was an increase in the *Dialister* genus ( $p = 0,006$ ) and *Prevotella copri* species ( $p = 0,007$ ) in patients with psoriasis compared to the control group. A reduction in the *Ruminococcus* ( $p = 0,037$ ), *Lachnospira* ( $p = 0,002$ ) and *Blautia* ( $p = 0,028$ ) genera, as well as in the *Akkermansia muciniphila* species ( $p = 0,035$ ), was also verified in the psoriasis group compared to the control group. Furthermore, patients with psoriasis exhibited less gut microbiota diversity than controls.

**Key-words:** Gut microbiome, Dysbiosis, *Akkermansia muciniphila*, Psoriasis, Psoriatic arthritis, Inflammatory bowel disease.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Pacientes incluídos e excluídos.....	36
FIGURA 2 – Frequência relativa dos 10 gêneros mais abundantes.....	39
FIGURA 3 – Diagrama de Venn.....	40
FIGURA 4 - Táxons que apresentaram diferença significativa.....	41
FIGURA 5 - Alfa biodiversidade.....	42
FIGURA 6 - Beta biodiversidade.....	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estudos de microbiota intestinal em psoríase .....	27
TABELA 2 – Características demográficas e clínicas.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ASAS - *Spondyloarthritis International Society*  
ATP - adenosina trifosfato  
BSA - *Body Surface Area*  
CASPAR - *Classification for Psoriatic Arthritis*  
DMARDs - drogasificadoras de doença  
IFN - interferon  
IL - interleucina  
IMC - índice de massa corporal  
OTUs - *operational taxonomic unit*  
PASI - *Psoriasis Area and Severity Index*  
PCR - polymerase chain reaction  
PGA - *Physician Global Assessment*  
SCFAs - *Short-Chain Fatty Acids* (ácidos graxos de cadeia curta)  
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido  
TGF - transforming growth factor  
Th - T *helper*  
TMA - triletilamina  
TMAO - precursor do óxido de triletilamina  
TNF - *tumor necrosis factor*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
1.2	OBJETIVOS .....	15
1.2.1	Objetivo geral .....	15
1.2.2	Objetivos específicos.....	15
1.3	METODOLOGIA.....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	PSORÍASE .....	17
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL E O BALANÇO TH17/T REG .....	21
2.3	MICROBIOTA E PSORÍASE .....	23
2.4	ESTUDOS DESCRITIVOS NA PSORÍASE .....	26
2.5	MICROBIOTA E TERAPÊUTICA.....	28
2.6	ANÁLISE DA MICROBIOTA.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica cutânea imunomediada. A associação com a artrite psoriásica, a maior prevalência de doença inflamatória intestinal e de comorbidades cardiovasculares e metabólicas como a obesidade e o diabetes mellitus demonstram o caráter inflamatório sistêmico da doença. Embora sua patogênese não esteja completamente esclarecida, fatores genéticos, ambientais e imunológicos estão notadamente relacionados. Crescentes evidências apontam para o papel da microbiota cutânea e intestinal na patogênese da psoríase (MYERS et al., 2019; YAN et al., 2017).

O termo microbiota refere-se a todos os microrganismos que vivem em um ambiente como pele, intestino, entre outros. O relacionamento harmonioso entre os microrganismos e o hospedeiro é essencial para o bem estar do hospedeiro e o desenvolvimento da capacidade de aproveitar as atividades bacterianas (simbiose), tolerar a exposição antigênica bacteriana e controlar os efeitos patogênicos (COSTA; WEESE, 2019). O avanço em métodos independentes de cultura, com técnicas de sequenciamento de última geração, facilitou e expandiu o entendimento da microbiota e suas implicações. Estudos recentes sugerem que alterações na composição e diversidade da microbiota (disbiose) podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, entre elas doenças inflamatórias, metabólicas e cardiovasculares (KOMINE et al., 2020).

A disbiose cutânea pode ser ocasionada por uma série de fatores como predisposição genética, infecções, dieta e uso de antibióticos; o efeito nocivo da disbiose cutânea envolveria ativação desregulada de células imunes e quebra de barreira epitelial. Estudos sobre o microbioma cutâneo revelaram uma abundância aumentada de *Streptococcus* e diminuída de *Propionibacterium* em pacientes com psoríase. *Propionibacterium* é o principal componente da microbiota cutânea normal e produtor de propionato, um ácido graxo de cadeia curta (*Short-Chain Fatty Acid* - SCFA), que modula o sistema imunológico (YAN et al., 2017).

Uma maior prevalência de doença inflamatória intestinal em pacientes com psoríase é descrita, especialmente naqueles com artrite psoriásica, classificada no grupo das espondiloartrites. Assim como descrito nas doenças inflamatórias

intestinais e nas espondiloartrites, a disbiose intestinal parece ter o potencial de interferir nos mecanismos de regulação imune, induzindo a ativação da via T *helper* 17 (Th17) e a disfunção das células T reguladoras (T reg), levando indivíduos geneticamente suscetíveis a desenvolver psoríase e artrite psoriática. O desbalanço Th17/Treg compromete a integridade da barreira intestinal, o que predispõe à translocação bacteriana, permitindo que ao atingir a circulação sistêmica, o DNA bacteriano dispare respostas imunológicas à distância incluindo a pele, envolvendo a diminuição da tolerância imunológica e propensão à inflamação. Em relação aos metabólitos derivados da microbiota intestinal, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) estimulam a diferenciação em T reg inibem a via Th17 (YAN et al., 2017; MYERS et al., 2019).

A espécie *Akkermansia muciniphila*, importante produtora de SCFAs, está associada à integridade da mucosa intestinal saudável. Estudos recentes descreveram a redução da espécie *Akkermansia muciniphila* na microbiota intestinal de pacientes com psoríase comparado a controles, sugerindo que a espécie possa ser a assinatura da microbiota intestinal da psoríase (TAN et al., 2018; CHEN et al., 2018).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Contribuir para melhor elucidação do papel da microbiota na patogênese da psoríase, buscando identificar possíveis biomarcadores que auxiliarão futuramente no diagnóstico precoce e na escolha ou desenvolvimento de tratamentos mais individualizados e eficazes.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição e a diversidade da microbiota intestinal na psoríase em comparação a controles saudáveis.

### 1.2.1 Objetivos específicos

Avaliar quais os táxons apresentam diferença significativa entre pacientes com psoríase e grupo controle;

Avaliar se há modificações na diversidade da microbiota intestinal de pacientes com psoríase comparado a controles.

### 1.3 METODOLOGIA

Estudo observacional e transversal caso controle que incluiu 21 voluntários com diagnóstico de psoríase, do ambulatório de Dermatologia do HC-UFPR e do centro de pesquisas Edumed, e 24 voluntários sem diagnóstico de psoríase provenientes da comunidade. Foram observados critérios de inclusão e exclusão e realizado pareamento entre os grupos.

Amostras de fezes de cada participante foram coletadas e a análise da microbiota intestinal foi realizada por sequenciamento do gene 16S rRNA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PSORÍASE

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada e predominantemente cutânea, que apresenta prevalência de aproximadamente 3% na população adulta dos Estados Unidos (RACHAKONDA; SCHUPP; ARMSTRONG, 2014). No Brasil a prevalência é estimada em 1,31% (PALMA et al., 2020). É mais frequente em adultos que em crianças e a proporção de homens e mulheres é semelhante (MICHALEK; LORING; JOHN, 2017).

A patogênese da psoríase é complexa e não está totalmente esclarecida. Suscetibilidade genética e fatores ambientais (como infecções, medicamentos, dieta, obesidade, tabagismo, trauma e estresse) são componentes fortemente relacionados (ZENG et al., 2017). É uma desordem em que tanto o sistema imune inato quanto adaptativo tem papel central, envolvendo queratinócitos, células dendríticas e linfócitos T. A via T *helper* 17 (Th17) parece ser a principal indutora de inflamação (KOMINE et al., 2020; GREB, 2016). Uma injúria externa em indivíduos geneticamente suscetíveis leva as células dendríticas plasmocitoides a secretar interferon (IFN) alfa, IFN beta e *tumor necrosis factor* (TNF) alfa, que ativam células dendríticas mieloides a secretar interleucina-12 (IL-12), que induz a diferenciação de linfócitos T naíve em Th1, e IL-23, que induz a diferenciação de linfócitos T naíve em Th17 e Th22. Células Th1 secretam IFN gama e TNF alfa, células Th22 secretam IL-22 e células Th17 secretam IL-17 principalmente. Estas citocinas levam a alterações na derme e epiderme que incluem a proliferação dos queratinócitos e espessamento cutâneo, além de vasodilatação, angiogênese e expressão de moléculas de adesão endotelial para recrutamento adicional de células inflamatórias (GREB et al, 2016). Os queratinócitos, através da liberação de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, também têm papel na amplificação da inflamação e sua autoperpetuação, sustentando as lesões crônicas da psoríase (LOWES et al., 2013; KOMINE et al., 2020).

A manifestação cutânea mais comum da psoríase é a psoríase vulgar ou em placas, que representa de 80 a 90% dos casos (KIM; JEROME; YEUNG, 2017). É caracterizada por placas eritematosas e descamativas bem definidas que ocorrem

mais comumente em superfícies extensoras, couro cabeludo, tronco e prega glútea, mas também pode afetar palmas, plantas, áreas flexurais (esta uma variante conhecida como psoríase invertida) e região ungueal. Fenômeno de Koebner (desenvolvimento de lesões em locais de trauma), sinal de Auspitz (pequenos pontos hemorrágicos após remoção de escamas) e prurido podem estar presentes (KIM; JEROME; YEUNG, 2017; ARMSTRONG; READ, 2020). Outras variantes da psoríase incluem a psoríase gutata (múltiplas pápulas), a psoríase pustulosa (pústulas estéreis, na forma localizada especialmente palmo-plantar ou na forma generalizada) e a psoríase eritrodérmica (eritema generalizado em >75% do corpo) (KIM; JEROME; YEUNG, 2017; ARMSTRONG; READ, 2020).

O diagnóstico de psoríase é frequentemente clínico, porém investigação adicional histológica por biópsia de pele pode ser útil (GREB, 2016). Diversas características são evidentes na histologia da psoríase, incluindo acantose (aumento da espessura da epiderme causada por queratinócitos), hiperkeratose (aumento do extrato córneo externo), parakeratose (retenção de núcleos na camada córnea pela maturação acelerada das células epidérmicas e ausência da camada granulosa), microabscessos de Munro (coleções de neutrófilos na epiderme), infiltrado imune mononuclear na derme e dilatação de vasos sanguíneos (que torna a lesão eritematosa) (GREB, 2016).

A gravidade da doença cutânea pode ser avaliada por medidas como o *Physician Global Assessment* ou PGA (pontuação que avalia eritema, descamação e endurecimento das lesões), *Body Surface Area* ou BSA (porcentagem da superfície cutânea acometida) e o *Psoriasis Area and Severity Index* ou PASI (avalia as lesões em eritema, descamação e endurecimento, combinado ao BSA, com pontuação que varia de 0 a 72) (GREB, 2016). Quanto maior a pontuação destes escores, maior a gravidade da doença. Psoríase leve é classificada como BSA <3%, moderada de 3% a 10% e grave >10% (KIM; JEROME; YEUNG, 2017). PASI >10 ou BSA >10% são parâmetros utilizados para indicação de terapia sistêmica (PALMA et al., 2020). O PASI também é utilizado para avaliar resposta ao tratamento, por exemplo, PASI 75% significa redução de 75% do PASI comparado ao pré-tratamento (GREB, 2016).

Segundo dados recentes de meta-análise, a prevalência de artrite psoriásica em pacientes com psoríase é de 19,5% (ALINAGHI et al., 2019). A psoríase precede a artrite em 10 anos em média, porém, em cerca de 15% dos casos ocorrem

simultaneamente ou a artrite precede a psoríase (RITCHLIN; COLBERT; GLADMAN, 2017). A *Classification for Psoriatic Arthritis* (CASPAR), publicada em 2006, considera como artrite psoriásica os pacientes com doença inflamatória articular (articulação periférica, axial ou entesite) de acordo com a pontuação que envolve evidência de psoríase, lesões ungueais, dactilite, fator reumatoide negativo e achado radiográfico de crescimento ósseo justa-articular excluindo osteófitos (especificidade de 98,7% e sensibilidade de 91,4%) (TAYLOR et al., 2006). Moll e Wright (1973) descreveram cinco subtipos clínicos de artrite psoriásica: oligoarticular assimétrica, poliarticular simétrica, acometimento de interfalangeanas distais, envolvimento axial e artrite mutilante. Devido a características genéticas (HLAB-27), imunológicas (ênfase nas células Th17) e clínicas, a artrite psoriásica é classificada no grupo das espondiloartrites (RITCHLIN; COLBERT; GLADMAN, 2017). Espondiloartrites refere-se a um grupo de doenças inflamatórias caracterizado clinicamente pelo envolvimento do esqueleto axial, articulações periféricas, entesite e sítios extra-articulares (uveíte, psoríase e doença inflamatória intestinal) (PARAMARTA; BAETEN, 2014). Também pertencem ao grupo das espondiloartrites a espondilite anquilosante (o protótipo das espondiloartrites), a artrite reativa, a espondiloartrite relacionada com doença inflamatória intestinal e um subgrupo de artrite idiopática juvenil (DOUGADOS; BAETEN, 2011).

Segundo Eppinga et al. (2017), a prevalência de doença inflamatória intestinal em paciente com psoríase é quatro vezes maior comparado à população em geral (1,6% versus 0,4%), sendo maior em pacientes com artrite psoriásica comparado à pacientes com psoríase apenas (3% versus 1,4%). Uma meta-análise também demonstrou que pacientes com psoríase têm risco aumentado de doença inflamatória intestinal (FU; LEE; CHI, 2018). Possíveis explicações para a associação entre psoríase e doença inflamatória intestinal incluem anormalidades genéticas, disfunção imunológica, inflamação sistêmica e desregulação da microbiota intestinal (FU; LEE; CHI, 2018). A mucosa intestinal de pacientes com psoríase ativa associada com artrite psoriásica, sem os sintomas intestinais, mostram lesões microscópicas mesmo quando a mucosa parecia macroscopicamente normal (SCARPA et al., 2000). Inflamação intestinal à histologia, na maioria das vezes subclínica, é encontrada em cerca de 60 a 70% dos pacientes com espondiloartrites em geral (MIELANTS et al., 1995). Pode-se supor que a inflamação intestinal esteja envolvida na iniciação da artrite psoriásica ou progressão da psoríase para artrite psoriásica, conforme a

observação de níveis de calprotectina fecal (marcador de inflamação intestinal) mais elevados em artrite psoriásica versus psoríase, relacionados com lesões cutâneas mais graves e envolvimento articular axial (ADARSH et al., 2019). A sobreposição entre articulação e pele e entre articulação e doença inflamatória intestinal é importante no entendimento da fisiopatologia da artrite psoriásica (EPPINGA, 2014).

Dados de literatura também mostram associação entre doenças cardiovasculares e metabólicas (TAKESHITA et al., 2017). Uma metanálise de 2013, mostrou que a psoríase está associada ao aumento de risco de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico, sendo que a psoríase grave está associada com maior risco de mortalidade cardiovascular (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013). Em outro estudo, uma coorte de pacientes com psoríase grave, verificou-se maior risco cardiovascular comparado ao grupo controle, independente dos fatores de risco tradicionais como diabetes, hipertensão, dislipidemia, obesidade e tabagismo (MEHTA et al., 2010). A via inflamatória Th1 pode ligar a patogênese da psoríase ao desenvolvimento de aterosclerose e doença cardiovascular, no entanto, essa associação permanece controversa (MEHTA et al., 2010; ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013). A obesidade é um fator de risco independente para incidência de psoríase e relaciona-se com maior gravidade da psoríase (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013). Há evidências que o aumento na produção de adipocinas pró-inflamatórias (leptina) e redução de adipocinas anti-inflamatórias (adiponectina), além da secreção de IL-6 e TNF alfa pelo tecido adiposo, verificados na obesidade, contribuem para o estado inflamatório da psoríase (JENSEN; SKOV, 2016). Hipertensão arterial e *diabetes mellitus* são mais prevalentes em pacientes com psoríase, independente dos fatores de risco tradicionais, sendo mais comuns em pacientes com psoríase grave (TAKESHITA et al., 2017). Dislipidemia também é mais prevalente em pacientes com psoríase e alguns estudos sugerem que a dislipidemia pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da psoríase (TAKESHITA et al., 2017). A prevalência de síndrome metabólica (definida pela combinação de obesidade abdominal, resistência insulínica, disglucemia, dislipidemia e hipertensão) em pacientes com psoríase varia de 20 a 50%, também mais comum em pacientes com psoríase grave (GISONDI et al., 2018).

Estresse psicológico e privação de sono desempenham papel importante no desencadeamento ou exacerbação da psoríase. O mecanismo exato permanece

desconhecido, contudo, há evidências que as principais vias envolvem o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o eixo simpático-adrenal-medular, o sistema nervoso periférico e sistema imune (YANG; ZHENG, 2020). A psoríase tende a apresentar impacto negativo na qualidade de vida e associação com disfunções psicossociais. Comparado à população geral, a psoríase está associada com aumento do risco de depressão, ansiedade e ideação suicida (KURD et al., 2010; DOWLATSHAHI et al., 2014).

O tratamento para psoríase consiste em medicamentos tópicos e sistêmicos. Para psoríase leve, recomenda-se tratamento tópico com corticosteroides, análogos de vitamina D como o calcipotriol, inibidor de calcineurina como tacrolimus, ou queratolíticos como retinoide e ácido salicílico; fototerapia direcionada também está recomendada para tratamento destes pacientes (MENTER et al., 2019; PALMA et al., 2020). Para tratamento de psoríase cutânea moderada a grave recomenda-se o uso de terapia sistêmica, podendo ser associada com terapia tópica adjuvante. Como terapia sistêmica estão recomendados medicamentos orais (que incluem acitretina, metotrexate e ciclosporina), imunobiológicos (anti-TNF alfa, anti-IL17, anti-IL12/23 e anti-IL23) ou fototerapia (MENTER et al., 2019; MENTER et al., 2020; PALMA et al., 2020). Os anti-IL17, anti-IL12/23 e anti-IL23 agem inibindo a principal via imunológica relacionada à patogenia da doença. Já a inibição do TNF alfa na psoríase e artrite psoriásica é mais complexa e provavelmente os benefícios terapêuticos resultam do efeito indireto no eixo IL-17/IL-23 (BLAUVELT; CHIRICOZZI, 2018).

## 2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E O BALANÇO TH17/T REG

O sistema imunológico fornece proteção contra patógenos, porém, também é capaz de atacar os próprios tecidos (LEE, 2018). As células T CD4 coordenam diversas respostas imunológicas à diversos patógenos. As células T CD4 são ativadas após a ligação do receptor de células T (TCR) e do receptor co-estimulador (CD28) ao complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC II) e molécula co-estimuladora (B7) das células apresentadoras de antígenos (APC). As células CD4 ativadas se diferenciam em subconjuntos de células efetoras com funções diferentes, esses tipos de células incluem Th1, Th2, Th17 e T reg. Células Th1 estimulam macrófagos e resposta imune a patógenos intracelulares; as células Th2 estimulam mastócitos, basófilos e eosinófilos mediando resposta imune a helmintos; as células

Th17 estimulam vários tipos de células para recrutar neutrófilos mediando resposta imune a bactérias extracelulares e fungos; T reg inibe a resposta imunológica e mantém o equilíbrio do sistema imune (LEE, 2018).

O transforming growth factor (TGF) beta induz a formação de Th17 e T reg. Na presença TGF beta e de IL-6 e IL-21 as células T CD4 naïve se diferenciam em Th17, porém, na ausência das citocinas pró-inflamatórias, o TGF beta junto com a IL-2 e o fator de transcrição Foxp3 induzem a diferenciação para T reg. Th17 produz IL-17, IL-22 e IL-23, recrutando neutrófilos e promovendo inflamação no sítio da infecção. Em contraste, T reg produz citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF beta suprimindo atividade de várias células inflamatórias e conseqüentemente inibindo a resposta imune (LEE, 2018). As células Th17 tem papel importante na autoimunidade, como o q ocorre nas espondiloartrites, doenças intestinais inflamatórias e psoríase; em contraste as células T reg inibem a autoimunidade (LEE, 2018). Muitos fatores influenciam o balanço Th17 / T reg, além das citocinas descritas, como sinais de TCR, sinais coestimuladores, estabilidade Foxp3, alterações metabólicas e a microbiota (LEE, 2018; CHENG et al., 2019).

O trato intestinal é colonizado por um grande número de microrganismos comensais, incluindo bactérias, fungos e vírus, que são coletivamente chamados de microbiota intestinal (LEE, 2018; CHENG et al., 2019). Muitos fatores interferem na composição e diversidade da microbiota intestinal, incluindo predisposição genética, via de parto, envelhecimento, comorbidades, dieta, infecções e uso de medicamentos (NICHOLSON et al., 2012). As comunidades microbianas que colonizam o intestino humano influenciam muitos aspectos da saúde, incluindo a absorção de nutrientes e modulação do sistema imunológico tanto da mucosa intestinal quanto sistêmico. Porém, também podem ser fonte de infecção gastrointestinal e contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas e inflamatórias. (FUJIMURA et al., 2010; FLINT et al., 2012).

Uma vez que a maioria dos antígenos derivados de alimentos e da microbiota comensal intestinal não são prejudiciais, as respostas imunológicas contra esses antígenos devem ser suprimidas. Sendo assim, o intestino é um local em que a tolerância imunológica é fundamental para a manutenção da homeostase imunológica (LEE, 2018). Tem sido demonstrado que a microbiota intestinal interage com células

imunes modulando vias de sinalização específicas envolvendo processos imunes inatos e adaptativos, exibindo propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (LEE, 2018; CHENG et al., 2019). Recentes descobertas mostram que organismos específicos da microbiota intestinal moldam o equilíbrio das células Th17 e T reg, como *Clostridium* cluster IV e XIVa e *Bacteroides fragilis*, que promovem indução de células T reg, enquanto que bactérias filamentosas segmentadas, alternativamente, promovem indução de células Th17 (LEE, 2018; CHENG et al., 2019). Com relação aos metabólitos derivado da microbiota intestinal, pesquisadores descobriram que os SCFAs e adenosina trifosfato (ATP) estimulam a diferenciação de T reg e Th17 respectivamente (CHENG et al., 2019). O equilíbrio geral da microbiota intestinal é vital e qualquer mudança em sua composição ou diversidade, pode levar ao desequilíbrio do sistema imunológico, porém, os mecanismos pelos quais o microbioma intestinal influencia o equilíbrio de Th17 e T reg ainda são pouco conhecidos (CHENG et al., 2019).

Dados clínicos e experimentais sugerem que a disbiose intestinal parece desempenhar um papel fundamental na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. Embora os estudos tenham demonstrado resultados inconsistentes em relação à composição e diversidade, o achado mais frequentemente relatado foi a redução de *Faecalibacterium prausnitzii* e *Akkermansia*, importantes produtores de SCFAs, e o aumento de *Escherichia coli* em pacientes com doenças inflamatórias intestinais comparado a controles (NISHIDA et al., 2018; PITTAYANON et al., 2020).

### 2.3 MICROBIOTA E PSORÍASE

O intestino e a pele são órgãos densamente vascularizados, ricamente inervados e com importante função imune e neuroendócrina. Sendo nossa interface primária com o ambiente externo, são essenciais para a manutenção da homeostase fisiológica. Em estado de homeostase, a pele desempenha papel na proteção, regulação da temperatura e controle de água corporal; sua constante renovação também é essencial para este estado. Paralelamente, assim como o intestino, a pele é colonizada por uma abundante variedade de bactérias, fungos e vírus. Diversos fatores interferem na composição e diversidade da microbiota cutânea, como predisposição genética, infecções, dieta e uso de antibióticos. O efeito nocivo da disbiose cutânea envolve ativação desregulada de células imunes e quebra de

barreira epitelial. Partindo desse conhecimento sugere-se que disbiose cutânea pode influenciar o desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias cutâneas, como a acne, dermatite atópica, hidradenite supurativa e psoríase (BALATO et al., 2019).

Os principais filos que fazem parte da microbiota cutânea são: *Actinobacteria* (51.8%), *Firmicutes* (24.4%), *Proteobacteria* (16.5%) e *Bacteroidetes* (6.3%); enquanto que a maioria dos gêneros identificados são *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus* (BALATO et al., 2019). Estudos sobre o microbioma cutâneo revelaram uma abundância diminuída de *Propionibacterium* em pacientes com psoríase, principal componente da microbiota cutânea normal e produtor de propionato, um SFCA, que modula o sistema imunológico (YAN et al., 2017). Infecções por *Streptococcus* têm sido associadas ao desenvolvimento de psoríase gutata e o agravamento de psoríase em placas (YAN et al., 2017). Mudanças na abundância do gênero *Staphylococcus* são menos consistentes, sendo melhor compreendidas no nível de espécies, pois provavelmente espécies comensais como o *Staphylococcus epidermidis* (do filo firmicutes e que corresponde a mais de 90% de toda a microbiota cutânea aeróbia) têm ação antiinflamatória promovendo função de barreira contra a colonização por patógenos como o *Staphylococcus aureus* ((YAN et al., 2017; LEWIS et al., 2019).

A pele parece conter um microbioma autônomo, afetando os subconjuntos de células T locais e a inflamação local. O microbioma intestinal, em contraste, tem a capacidade de afetar tanto o sistema imunológico local da mucosa quanto o sistema imunológico sistêmico e órgãos distantes. Assim, as modificações da microbiota intestinal podem estar relacionadas com doenças autoimunes sistêmicas e estudos em doenças inflamatórias intestinais e espondiloartrites demonstram que a via Th17 tem uma função crucial neste mecanismo (; EPPINGA et al., 2014; CHIMENTI, 2018). Estudos sobre mecanismo de regulação imunológica na psoríase também sugerem que a disbiose intestinal é capaz de induzir ativação da via Th17 e disfunção de células T reg, levando ao desenvolvimento da doença (KOMINE et al., 2020).

A inflamação intestinal subclínica pode estar relacionada a alteração da integridade e aumento da permeabilidade intestinal, como visto em estudos que avaliaram biopsias intestinais em pacientes com psoríase; de forma não invasiva isso também foi verificado através do aumento da concentração de marcadores sorológicos de integridade intestinal (*intestinal fatty acid binding protein* (I-FABP) e

claudina-3) em pacientes com psoríase moderada a grave comparado a controles (SIKORA et al., 2018). A inflamação intestinal subclínica e a disfunção de barreira intestinal, relatada em pacientes com psoríase, deram origem ao conceito de eixo intestino-pele (SIKORA et al., 2020). Estudos também sugerem que a disbiose intestinal pode estar associada à psoríase ao alterar a permeabilidade de barreira intestinal e facilitar a translocação de bactérias para a corrente sanguínea; essas bactérias podem não ser replicantes, mas podem contribuir para manter um estado inflamatório crônico e sistêmico nesses indivíduos (VISSER; KELL; PRETORIUS, 2019).

Quanto aos estudos experimentais, o estudo conduzido por Zákostelská et al (2016), utilizou um modelo murino de psoríase induzido por imiquimod e verificou que o grupo criado em ambiente livre de germes e o grupo que utilizou antibióticos de amplo espectro apresentaram lesões cutâneas mais leves, assim como apresentaram menor grau de ativação de Th17, sugerindo o papel da microbiota na psoríase. O mesmo não foi verificado em camundongos que receberam antibiótico no período neonatal, conforme o estudo de psoríase experimental conduzido por Zanvit et al (2015), mostrando que o uso de antibióticos no período neonatal desregula a microbiota em adultos, aumentando a suscetibilidade para psoríase experimental.

Também é relevante destacar a importância da microbiota intestinal na associação entre psoríase e risco cardiovascular. Algumas bactérias da microbiota intestinal são conversores de carnitina e colina da carne vermelha e ovos em trimetilamina (TMA), precursor do metabólito trimetilamina-N-óxido (TMAO). TMAO altera o metabolismo do colesterol do hospedeiro e promove a ativação de macrófagos, levando ao aumento do risco cardiovascular. Um ensaio clínico avaliando homens saudáveis descobriu maior proporção de *Firmicutes* do que *Bacteroidetes* nas fezes de participantes que eram produtores de maiores níveis de TMAO. Níveis aumentados de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteroidetes* também foi associado a um aumento de índice de massa corporal (IMC). Assim, um desequilíbrio na proporção *Firmicutes* / *Bacteroidetes* no microbioma intestinal na psoríase pode refletir na associação com doenças cardiovasculares e metabólicas (MYERS et al., 2019; YAN et al, 2017).

## 2.4 ESTUDOS DESCRITIVOS DE MICROBIOTA INTESTINAL NA PSORÍASE

Na tabela 1 a seguir foram descritos os principais resultados de estudos sobre microbiota intestinal na psoríase, comparando pacientes com psoríase e grupo controle. Scher et al. (2015) avaliaram separadamente os grupos psoríase, artrite psoriásica e controle; e verificaram que o perfil da microbiota intestinal de pacientes com psoríase pareceu ser intermediário entre indivíduos saudáveis e pacientes com artrite psoriásica, sugerindo a presença de modificações na microbiota intestinal ao longo da história natural da doença. Exceto pelo estudo de Massalat et al. (2016) que utilizou o método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) quantitativa, os demais foram realizados por sequenciamento do gene 16S rRNA. Nota-se que os achados taxonômicos não são consistentes entre os estudos, considerando a potencial heterogeneidade da microbiota intestinal, os vários fatores que podem interferir na sua composição e a metodologia utilizada por cada estudo. Os resultados destes estudos serão discutidos em comparação com os resultados do presente estudo posteriormente.

Tabela 1 - Estudos de microbiota intestinal em psoríase

Autor	Participantes Pareamento	Principais achados em Pso ou PsA vs. controle	Critérios de exclusão	Plataforma de sequenciamento  Banco de dados de seqüências de referência
Scher et al. (2015)	15 Pso 16 APS 17 controles  <b>Pareamento:</b> gênero e idade	<b>Gênero:</b> ↓ Parabacteroides e Coprobacillus em Pso comparado a controle ↓ <i>Akkermansia</i> , <i>Ruminococcus</i> e <i>Pseudobutyrvibrio</i> em APS comparado a controle  <b>Diversidade:</b> menor em Pso e APS	Histórico de neoplasia, DII; Cirurgia gastrointestinal; Dieta parenteral ou macrobiótica; Em uso de probióticos; Uso de antibiótico nos últimos 3 meses; Uso atual ou prévio de corticosteróides, DMARDs ou imunobiológicos.	Plataforma: 454 GS FLX Titanium  Banco de dados: SILVA database
Massalat et al. (2016)	45 Pso 45 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade e IMC	↑ razão F/B	DII; Cirurgia gastrointestinal; Dietas extremas; Em uso de probióticos; Uso de antibióticos, corticosteroides sistêmicos ou terapia imunossupressora nos 3 últimos meses. Nada consta sobre APS associada.	PCR quantitativa  -
Tan et al. (2018)	14 Pso vulgar 14 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade e IMC	<b>Gênero:</b> ↑ <i>Enterococcus</i> e <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Akkermansia</i> <b>Espécie:</b> ↑ <i>Clostridium citroniae</i> ↓ <i>Akkermansia muciniphila</i>	Consumo de iogurte, pickes ou queijo nos últimos 3 dias; Em uso de anti-inflamatórios. <b>Controles:</b> sem histórico familiar de doenças autoimunes. Nada consta sobre APS associada.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: Ribosomal Database Project (RDP)
Chen et al. (2018)	32 Pso vulgar (4 com APS associada e 20 em uso de DMARDs) 64 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade e IMC, HAS, DM, nefropatias ou hepatopatias	↑ razão F/B <b>Gênero:</b> ↓ <i>Akkermansia</i> <b>Espécie:</b> ↓ <i>Prevotella stercorea</i> em pacientes com Pso em uso de imunobiológicos	Histórico de malignidade, quimioterapia ou radioterapia; Cirurgia gástrica; Gestantes, lactantes; Uso de antibióticos, próbióticos, inibidor de bomba de prótons ou antagonista do receptor H2 no último mês.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: Greengenes database
Codoñer et al. (2018)	52 Pso vulgar 300 controles de banco de microbiota	<b>Gênero:</b> ↑ <i>Akkermansia</i> , <i>Ruminococcus</i> e <i>Faecalibacterium</i> ↓ <i>Bacteroides</i>  <b>Diversidade:</b> maior no grupo Pso	DII, infecções bacterianas, cirrose hepática, DM; Em uso de corticosteroides, metotrexate, ciclosporina ou anti-TNF; Uso de antibióticos nas 2 últimas semanas. Nada consta sobre APS associada.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: National Center for Biotechnology Information
Huang et al. (2019)	35 Pso (7 com APS associada) 27 controles  <b>Pareamento:</b> gênero e idade	<b>Gênero:</b> Veillonella correlacionou-se positivamente com a dosagem de PCR	DII, doenças metabólicas; Cirurgia intestinal; Uso de antibióticos ou probióticos no último mês. Não foram detalhados os medicamentos em uso para tratamento da psoríase.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive database

Autor	Participantes Pareamento	Principais achados em Pso ou PsA vs. controle	Critérios de exclusão	Plataforma de sequenciamento  Banco de dados de seqüências de referência
Hidalgo-Cantabrana et al. (2019)	19 Pso (4 com APS associada) 20 controles  <b>Pareamento:</b> idade	↑ razão F/B <b>Gênero:</b> ↑ <i>Blautia</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Ruminococcus</i> ↓ <i>Alistipes</i> e <i>Faecalibacterium</i>  <b>Diversidade:</b> menor no grupo Pso	Em uso de medicamentos, exceto corticosteroide tópico; Uso de antibióticos ou probióticos nos últimos 3 meses.	Plataforma: Ion Gene Studio S5 sequencer  Banco de dados: SILVA database
Shapiro et al. (2019)	24 Pso (2 em uso de imunobiológicos). 22 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade, IMC e comorbidades	↑ razão F/ <b>Gênero:</b> ↑ <i>Blautia</i> e <i>Faecalibacterium</i> ↓ <i>Prevotella</i> <b>Espécie:</b> ↑ <i>Ruminococcus gnavus</i> , <i>Dorea formicigenerans</i> e <i>Collinsella aerofaciens</i> ↓ <i>Prevotella copri</i> e <i>Parabacteroides distasonis</i>	Uso de antibióticos nos 3 últimos meses. Nada consta sobre APS associada.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: Greengenes database
Yegorov et al. (2020)	20 Pso 20 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade e IMC (destes, 14 Pso e 7 controles foram avaliados para microbiota intestinal)	<b>Gênero:</b> ↑ <i>Faecalibacterium</i> ↓ <i>Oscillibacter</i> e <i>Roseburia</i>	APS associada, outras doenças cutâneas, comorbidades graves; Gestantes; Uso de antibióticos nos 3 últimos meses. Nada consta sobre uso de imunobiológicos.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados não informado
Dei-Cas et al. (2020)	55 Pso vulgar 27 controles  <b>Pareamento:</b> gênero, idade e IMC	<b>Gênero:</b> ↑ <i>Faecalibacterium</i> e <i>Blautia</i> ↓ <i>Bacteroides</i> e <i>Paraprevotella</i>  <b>Diversidade:</b> maior em Pso moderada a grave	HIV; Cirurgia gastrointestinal; Diets restritivas; Em uso de probióticos; Uso de antibiótico nos 3 últimos meses. <b>Psoríase:</b> APS associada, DII, em uso de tratamento tópico, sistêmico ou imunobiológico. <b>Controles:</b> histórico familiar de psoríase, doenças autoimunes, HAS, esteatose, DM, neoplasias, doenças graves, tabagismo.	Plataforma: Illumina MiSeq  Banco de dados: Greengenes database

Pso: psoríase; IMC: índice de massa corporal; DMARDs: drogas modificadoras de doença; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; APS: artrite psoriásica; F/B: *Firmicutes* / *Bacteroidetes*; PCR: proteína C reativa; DII: doença intestinal inflamatória; anti-TNF: anti fator de necrose tumoral; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

## 2.5 MICROBIOTA E TERAPÊUTICA NA PSORÍASE

Com relação à terapêutica com imunobiológicos, estudos em doenças inflamatórias intestinais sugerem que a composição da microbiota intestinal pode

predizer resposta ao tratamento, ou seja, atuar como um biomarcador útil para direcionar a escolha terapêutica ou monitorar o tratamento, prevendo melhores resultados (MAGNUSSON, 2016; DOHERTY, 2018). Yeh e colaboradores (2019) avaliaram a microbiota intestinal de pacientes com psoríase após tratamento com secuquinumabe e uestequinumabe e relataram alterações distintas, sendo que nos pacientes tratados com secuquinumabe as alterações da microbiota intestinal foram semelhantes às identificadas na disbiose das doenças inflamatórias intestinais, sugerindo aumento do risco de desenvolvimento de doença inflamatória intestinal relacionado ao tratamento.

Os conhecimentos sobre microbioma vêm sendo aplicados a estudos que visam avaliar terapêuticas que modificam intencionalmente o microbioma, como o uso de antibióticos, probióticos e transplante de microbiota fecal.

O uso de antibióticos é destinado a reduzir diretamente certas espécies bacterianas. Estudos mostraram que o uso de macrolídeo foi associado a uma melhora das lesões cutâneas de psoríase (MYERS et al., 2019)

Probióticos consistem em microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem conferir benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Os probióticos parecem exercer efeito benéfico por meio da modulação do sistema imunológico, mostram-se seguros e são de baixo custo. Existem poucos ensaios clínicos que avaliam o uso de probióticos no tratamento de doenças dermatológicas, e, embora promissores, ainda são difíceis de implementar na prática clínica devido à heterogeneidade do regime suplementar aplicado nos diferentes estudos (SZÁNTÓ et al., 2019). Outra limitação é que a colonização de bactérias probióticas no intestino tende a ser transitória (SZÁNTÓ et al., 2019). Até o momento, há dados escassos sobre o uso de probióticos em psoríase. Em um estudo experimental de psoríase em camundongos a administração oral de *Lactobacillus pentosus* GMNL-77 diminuiu significativamente as lesões cutâneas e reduziu as citocinas pró-inflamatórias TNF alfa, IL-6, IL17 e IL-23 (CHEN et al., 2017). O ensaio randomizado duplo cego conduzido por Groeger et al (2013) verificou redução nos níveis de proteína C reativa, TNF alfa e IL-6 associado à suplementação com *Bifidobacteria infantis* (do filo *Actinobacteria*), embora não tenha ficado claro a melhora clínica. Outro estudo randomizado duplo cego, conduzido por Navarro-López et al

(2019), relacionou melhora clínica à suplementação com uma mistura de probióticos contendo *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*.

O uso de transplante de microbiota fecal está bem estabelecido para o tratamento de infecção recorrente por *Clostridium difficile* (CAMMAROTA et al., 2017). Ensaio clínico randomizado placebo controlado avaliando o transplante de microbiota intestinal em doenças inflamatórias intestinais têm demonstrado bons resultados. Segundo recente metanálise, o transplante de microbiota fecal no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais demonstrou uma taxa de resposta clínica de 53,8%, com uma remissão de 37% (CALDEIRA et al., 2020). Um ensaio randomizado duplo cego controlado vem sendo conduzido para avaliação do transplante de microbiota fecal em artrite psoriásica não responsiva a metotrexate (KRAGSNAES et al., 2018).

## 2.6 ANÁLISE DA MICROBIOTA

O apropriado armazenamento e transporte da amostra fecal é essencial para evitar viés na composição da microbiota. Uma vez que realizar a extração do DNA em amostras frescas imediatamente após a coleta é impraticável, o congelamento rápido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  é comumente considerado a melhor prática para preservação da composição microbiana. O congelamento e armazenamento rápidos nem sempre são possíveis, especialmente quando os participantes realizam a coleta de amostras de fezes em domicílio. Se as amostras podem resistir a um período em temperatura ambiente permanece controverso. Recomenda-se que para a realização de sequenciamento do gene 16S rRNA, se o armazenamento rápido em temperatura ultrabaixa não for possível, mudanças na composição microbiana podem ser minimizadas pelo armazenamento e transporte de amostras a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 a 72 horas (GOODRICH et al., 2014; CHOO; LEONG; ROGERS, 2015). É importante também que os métodos de coleta e armazenamento sejam os mesmos para todas as amostras do estudo, evitando vieses de confusão (GOODRICH et al., 2014; KNIGHT et al., 2018).

A cultura bacteriana permite a identificação de apenas um subconjunto de espécies, estima-se que apenas 5 a 20% das bactérias são cultiváveis (COSTA; WEESE, 2019). Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para avaliar a microbiota e sua relação com o hospedeiro. Avanços no sequenciamento de DNA,

denominado “sequenciamento de nova geração”, permitem sequenciar milhões de fitas de DNA. Atualmente, os dados da microbiota são obtidos predominantemente pelos seguintes métodos: sequenciamento do gene 16S rRNA, que avalia a classificação taxonômica das bactérias para análise da associação entre o que está sendo estudado e a microbiota; análise metagenômica (chamada de "sequenciamento shotgun"), que sequencia fitas longas de DNA e retrata o potencial funcional; análise metatranscriptômica (sequenciamento de RNA mensageiro) e metaproteômica (análise de proteínas), usadas para descrever a expressão do gene ativo; e metabolômica, que avalia os subprodutos bacterianos (GOODRICH et al., 2014; KNIGHT et al., 2018; COSTA; WEESE, 2019).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é um método rápido e de menor custo em relação aos demais, correlaciona-se bem com o conteúdo genômico, tem à disposição grandes dados públicos para comparação e não é contaminado por DNA do hospedeiro. As limitações são: vieses de amplificação (incluindo a escolha de primers, que pode favorecer a detecção de bactérias específicas dificultando a comparação entre estudos), identificação taxonômica normalmente limitada ao nível de gênero e as informações funcionais são limitadas (KNIGHT et al., 2018; COSTA; WEESE, 2019).

O gene 16S rRNA é o mais utilizado para fornecer dados detalhados sobre a composição bacteriana, pois apresenta regiões altamente conservadas, que evoluem lentamente, e regiões hipervariáveis (V1 – V9), que podem ser usadas para determinar as espécies bacterianas. É encontrado em todas as bactérias, mas não nas células humanas (COSTA; WEESE, 2019).

As etapas para o sequenciamento do gene 16S rRNA incluem a extração do DNA bacteriano e amplificação de um segmento da região V1 – V9 do gene 16S rRNA por polymerase chain reaction (PCR), construção das bibliotecas metagenômicas, sequenciamento e análise bioinformática (GOODRICH et al., 2014; KNIGHT et al., 2018; COSTA; WEESE, 2019). As sequências são agrupadas em *operational taxonomic unit* (OTUs), que podem representar qualquer nível de similaridade taxonômica (GOODRICH et al., 2014; COSTA; WEESE, 2019). Por fim, uma etapa importante é o envio dos arquivos de sequência para bancos de dados públicos

(GOODRICH et al., 2014). É importante que os mesmos kits de reagentes sejam usados para todas as amostras do estudo (KNIGHT et al., 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional e transversal caso controle.

Foram incluídos no estudo 21 participantes diagnosticados com psoríase por Dermatologista (GREB, 2016), recrutados do Ambulatório de Psoríase e do Ambulatório de Dermatologia Geral do HC-UFPR e do Centro de Educação e Saúde Edumed em Curitiba, de agosto de 2019 a março de 2020. O recrutamento foi realizado nas consultas habituais, contato telefônico após busca ativa por pesquisa de prontuários médicos ou procura direta à Edumed. Na sequência também foram incluídos 24 voluntários sem diagnóstico de psoríase, provenientes da comunidade, pareados com os participantes com psoríase para gênero, idade, índice de massa corporal (IMC), comorbidades e tabagismo. Pacientes e controles residiam na cidade de Curitiba ou proximidades. Todos os participantes foram convidados a participar voluntariamente e mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram excluídos participantes com psoríase e participantes controle com  $\leq 18$  anos e  $\geq 70$  anos, histórico de doença inflamatória intestinal ou sintomas intestinais persistentes ou recorrentes, outras doenças autoimunes (exceto tireoidite de Hashimoto como causa de hipotireoidismo, por tratar-se de uma desordem algumas vezes associada ao contexto metabólico da psoríase), doença infecciosa, diabetes mellitus, nefropatias, hepatopatias, histórico de neoplasias, gestantes ou lactantes, submetidos à cirurgia de ressecção gástrica e/ou intestinal ou estoma, aqueles com dieta enteral, parenteral ou restritiva (como vegetarianos, veganos e intolerantes à lactose ou glúten), ou que faziam uso de probióticos ou utilizaram antibióticos nos últimos três meses, além daqueles que recusaram participar ou não entregaram a amostra e aqueles que residiam a uma distância que não permitisse o limite de 12 horas entre a coleta e entrega da amostra. Também foram excluídos os pacientes em uso de metotrexate ou ciclosporina, aqueles em uso atual ou prévio de imunobiológicos e aqueles com suspeita ou diagnóstico de artrite psoriásica pelos critérios classificatórios do ASAS (*Spondyloarthritis International Society*) e *Classification for Psoriatic Arthritis* (CASPAR) (TAYLOR et al., 2006).

Além dos dados demográficos e clínicos para pareamento, os participantes com psoríase também foram estratificados, no momento da inclusão no estudo, quanto ao tempo de doença, tipo de psoríase e uso de medicamentos tópicos, sistêmicos ou fototerapia. A atividade de doença foi avaliada pelo *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) e *Body Surface Area* (BSA), índices destinados à avaliação de acometimento cutâneo.

Uma amostra de fezes de cada participante foi coletada no momento da inclusão no estudo. As amostras foram coletadas em frasco estéril em domicílio, armazenadas em geladeira doméstica por até 12 horas e transportadas em isopor com gelo para serem imediatamente armazenadas à temperatura de -80°C na Edumed (GOODRICH et al., 2014; CHOO; LEONG; ROGERS, 2015; KNIGHT et al., 2018).

A análise da microbiota intestinal foi realizada pela empresa de biotecnologia GoGenetic em Curitiba - PR. Após as amostras serem descongeladas, para extração do DNA das amostras foi empregado o kit comercial “ZymoBIOMICS DNA®” seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific). Para avaliar a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com uma solução de brometo de etídeo 1% e visualizadas com luz ultravioleta em transiluminador de luz ultravioleta. Foi amplificado um segmento de 250 bases da região hipervariável V3-V4 do gene ribossomal 16S rRNA utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 94°C por 40 seg, 64°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto; seguido de 72°C por 10 minutos de extensão final. A partir destes amplificados foram construídas as bibliotecas metagenômicas utilizando-se o kit comercial “Nextera DNA Library Preparation Kit” da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® em protocolo paired-end (DEGNAN, P.H.; OCHMAN, H., 2012). As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME2 “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” (BOLYEN et al., 2019), seguindo-se um fluxo de trabalho que começa com a remoção de sequências de baixa qualidade, cloroplastos, mitocôndrias

e quimeras, para finalizar com a classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em táxons bacterianos usando-se o algoritmo DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) inserido no programa QIIME2, através do reconhecimento de variantes de sequência dos amplicons (ASVs). Para comparar as sequências foi utilizada a atualização (SILVA 132) do ano 2018 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database (YILMAZ et al., 2013). A classificação taxonômica das comunidades bacterianas por identificação de ASVs e métricas de alfa e beta biodiversidade foi realizada normalizando todas as amostras em 44,200 leituras. Para avaliar a qualidade do sequenciamento foram analisadas 4 amostras com microbiota conhecida, o controle do sequenciamento “Mock”.

A metodologia de análise da microbiota intestinal foi semelhante à utilizada em estudos em psoríase e artrite psoriásica (SIKORA et al., 2020).

As amostras coletadas foram de uso específico para esta pesquisa e destruídas ao término da análise.

Análise estatística: Teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar dois grupos independentes para variáveis qualitativas ordinais e quantitativas. Teste de Qui quadrado foi utilizado para comparar variáveis qualitativas nominais (sim ou não) de dois grupos independentes (Psoríase versus Controle). Para comparar a abundância de táxons identificados entre os dois grupos experimentais foi aplicado o teste de Wilcoxon ( $P < 0.05$ ). Análises de biodiversidade foram feitas com o pacote ggplot2 do programa R (WICKHAM, 2012). Análises de comparação taxonômica foram feitas com o programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles (PARKS et al., 2014). São apresentados unicamente resultados estatisticamente diferentes entre os diferentes grupos.

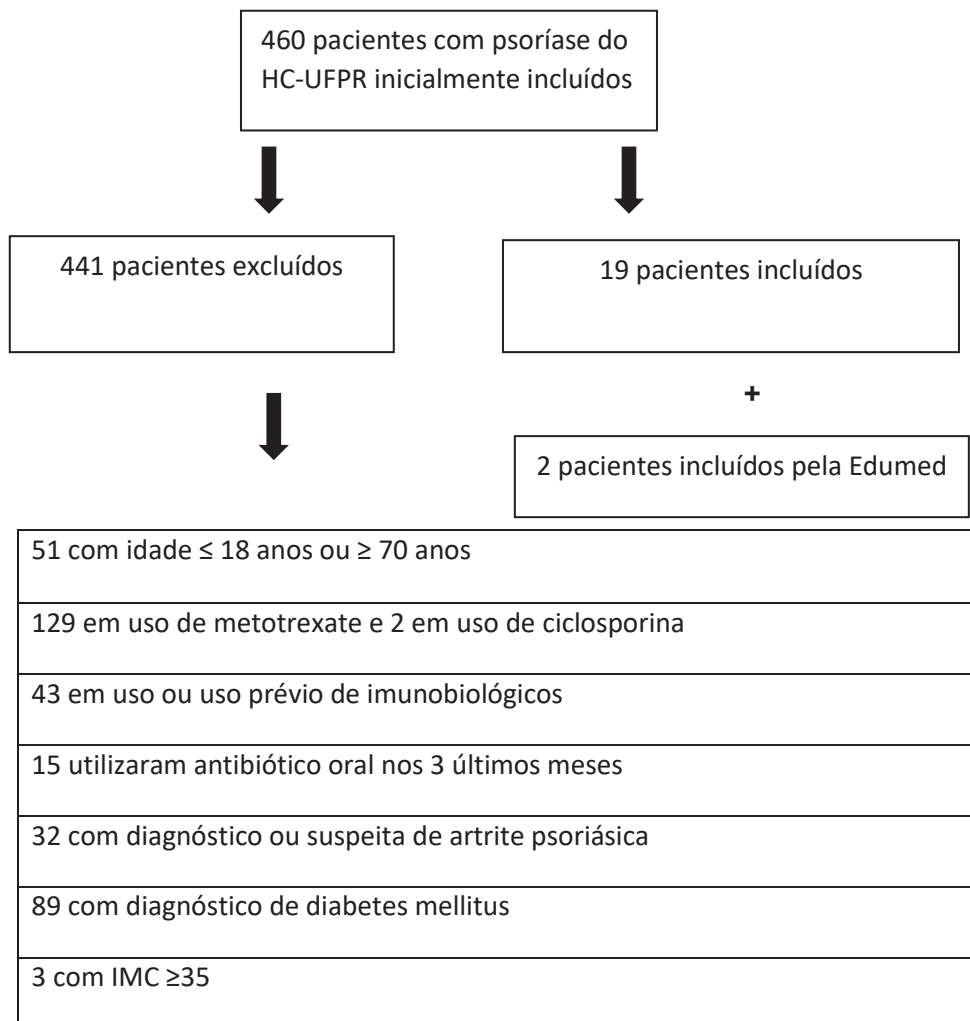
O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR - CAAE 05942919.9.0000.0096.

O projeto foi patrocinado financeiramente pela Sociedade Brasileira de Reumatologia.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

Foi realizada busca ativa pelos CIDs de psoríase no sistema eletrônico dos ambulatórios de Psoríase e Dermatologia Geral do HC-UFPR, sendo listados 523 pacientes. Estes pacientes foram avaliados durante consultas médicas habituais ou busca ativa de prontuário médico no arquivo físico do HC-UFPR e posterior contato telefônico para avaliação clínica na Edumed. O diagnóstico de psoríase não estava confirmado em 63 destes pacientes, portanto, foram incluídos 460 pacientes inicialmente. Aplicados os critérios de exclusão, foram efetivamente incluídos 19 pacientes, somados a mais dois pacientes por procura direta à Edumed, totalizando 21 pacientes incluídos no estudo e que tiveram suas amostras fecais analisadas. A Fig. 1 mostra o número de pacientes excluídos de acordo com cada critério, sendo que ao menos 144 pacientes apresentavam mais de um critério de exclusão.



1 com doença intestinal inflamatória
8 com outras doenças autoimunes
27 com diagnóstico ou histórico de neoplasia
10 com doenças infecciosas
23 com insuficiência renal crônica ou hepatopatia grave
1 gestante e 1 lactante
6 com histórico de cirurgia bariátrica
2 com dieta restritiva
1 em uso de probiótico
6 em investigações diagnósticas diversas
83 com residência distante
6 prontuários não encontrados
20 não possível contato telefônico
13 recusa em participar, não comparecimento para avaliação ou não entrega da amostra
1 contaminação da amostra (66,31% de <i>Streptococcus</i> )

Fig. 1 – Pacientes incluídos e excluídos segundo critérios descritos.

Os pacientes foram pareados com os controles para gênero, idade, IMC, comorbidades e tabagismo (Tabela 2) não havendo diferença estatística entre os grupos. A Tabela 1 também descreve os dados clínicos dos pacientes com psoríase; destaca-se que a quase totalidade dos pacientes (18 pacientes) apresentava psoríase em placa (vulgar) e apenas 1 pacientes apresentava doença grave (BSA>10%), os demais apresentavam doença leve (BSA<3%) ou moderada (BSA 3-10%) (KIM; JEROME; YEUNG, 2017).

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas dos pacientes com psoríase e controles.

Característica	Psoríase (n = 21)	Controle (n = 24)	P valor
Etnia (%)			
Branca	81,0	95,8	0,1130
Parda	19,0	4,2	0,1130
Masculino (%)	33,3	37,5	0,7708
Feminino (%)	66,7	62,5	0,7708
Idade (anos) média ± DP	50,1 (± 11,73)	49,4 (± 10,06)	0,8341
IMC média ± DP	27,0 (± 4,17)	26,6 (± 4,12)	0,6121
IMC <25 (%)	33,3	37,5	0,5121
Sobrepeso (%)	42,9	41,5	0,8041
Obesidade (%)	23,8	20,8	0,8041
Hipertensão arterial (%)	19	20,8	0,8812
Dislipidemia (%)	19	16,7	0,8349
Hipotireoidismo (%)	14,2	8,3	0,5262
Tabagismo (%)	33,3	20,8	0,3442
Tipo de psoríase (%)			
Placa	85,7	NA	NA
Pustulosa	9,5	NA	NA
Gutata	4,8	NA	NA
Eritrodérmica	0	NA	NA
Duração psoríase média (anos) ± DP	13,1 (± 9,72)	NA	NA
Medicamentos em uso (%)			
Corticosteroide tópico	81	0	NA
Calcipotriol	42,8	0	NA
Acitretina	28,6	0	NA
Fototerapia	0	0	NA
PASI média ± DP	2,1 (± 2,05)	NA	NA
BSA média ± DP	4,4 (± 4,05)	NA	NA
BSA <3% (%)	52,4	NA	NA
BSA 3-10% (%)	42,8	NA	NA
BSA >10% (%)	4,8	NA	NA

\* IMC = Índice de Massa Corporal; PASI = Psoriasis Area Severity Index; BSA = Body Surface Area.

#### 4.2 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA

Quando analisada a comunidade bacteriana pelos diferentes grupos (psoríase e controle) foram identificados 157 táxons, distribuídos entre 107 gêneros e 50 espécies bacterianas (Apêndice 1). A partir deste conjunto foi observado que os 10 táxons mais abundantes no grupo controle foram os gêneros *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Blautia*, *Oscillospira*, *Phascolarctobacterium* e as espécies *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* e *Prevotella copri* (Figura 2). Por outro lado, no grupo psoríase os 10 táxons mais abundantes foram os gêneros *Bacteroides*, *Dialister*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Oscillospira* e as espécies *Prevotella copri*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Prevotella stercorea*

(Figura 2). Adicionalmente, foi identificado que entre os táxons mais abundantes uma grande porcentagem foi representada pela categoria “Unclassified” que agrupa diferentes níveis taxonômicos sem identidade taxonômica (ainda não identificados em banco de dados), isso foi visto nos dois grupos (Figura 2).

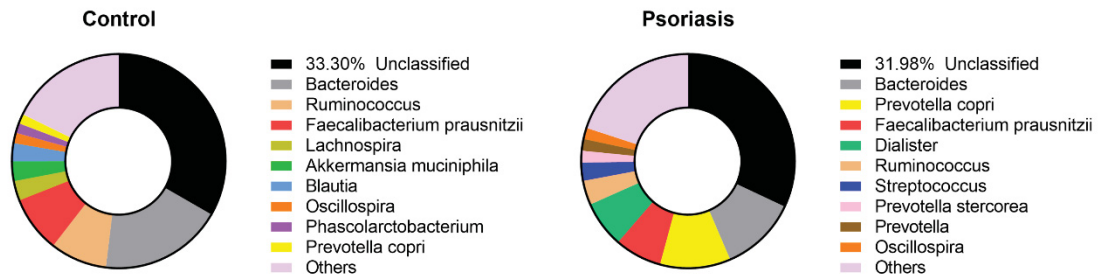
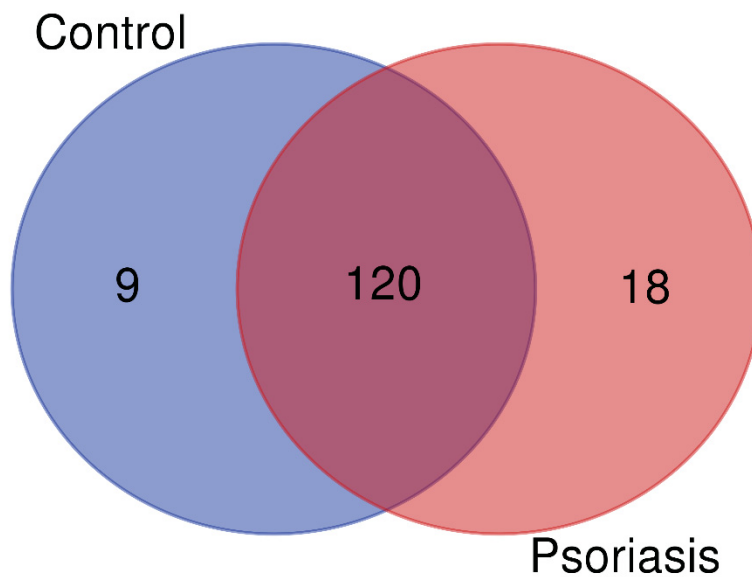


Fig. 2 – Frequência relativa dos 10 táxons mais abundantes em cada um dos grupos.

Análises adicionais mostraram que parte do conjunto dos organismos mais abundantes nos dois grupos representavam o núcleo central da microbiota, táxons que são conhecidos como *core microbiota* e mostram os táxons em comum para os dois grupos e aqueles exclusivos de cada grupo (Figura 3). Assim, foi observado que no grupo controle houve nove táxons exclusivos, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Sarcina*, *Anaerobiospirillum*, vadinCA11, *Anaerofustis*, *Brachyspira*, *Cellulomonas* e a espécie *Lactobacillus iners*. Já no grupo psoríase foram identificados 18 táxons únicos, entre eles ressaltamos *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Proteus* e as espécies *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus reuteri*. Por fim, 120 táxons foram comuns em ambos os grupos (Apêndice 2).



**Fig. 3** – Diagrama de Venn representando o core microbiota das comunidades bacterianas por grupo, foram usados os táxons a nível de gênero e espécie na construção do diagrama. 120 táxons foram identificados como o *core microbiota* e 18 táxons foram exclusivos do grupo psoríase.

Análises comparativas entre os grupos mostraram diferenças significativas na abundância de 10 táxons, *Lachnospira*, *Christensenella*, *Dialister*, *Catenibacterium*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Anaerofustis* e das espécies *Prevotella copri*, *Veillonella parvula* e *Akkermansia muciniphila*. Nesse sentido, nos pacientes com psoríase foi observado aumento significativo das espécies *Prevotella copri*, *Veillonella parvula* e dos gêneros *Dialister* e *Catenibacterium* (Figura 4). Por outro lado, no grupo controle foi observado aumento significativo da espécie *Akkermansia muciniphila* e dos gêneros *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Blautia*, *Christensenella* e *Anaerofustis* (Figura 4). Os valores exatos das médias de abundância, desvio padrão e valores de *p* são apresentados no (Apêndice 3).

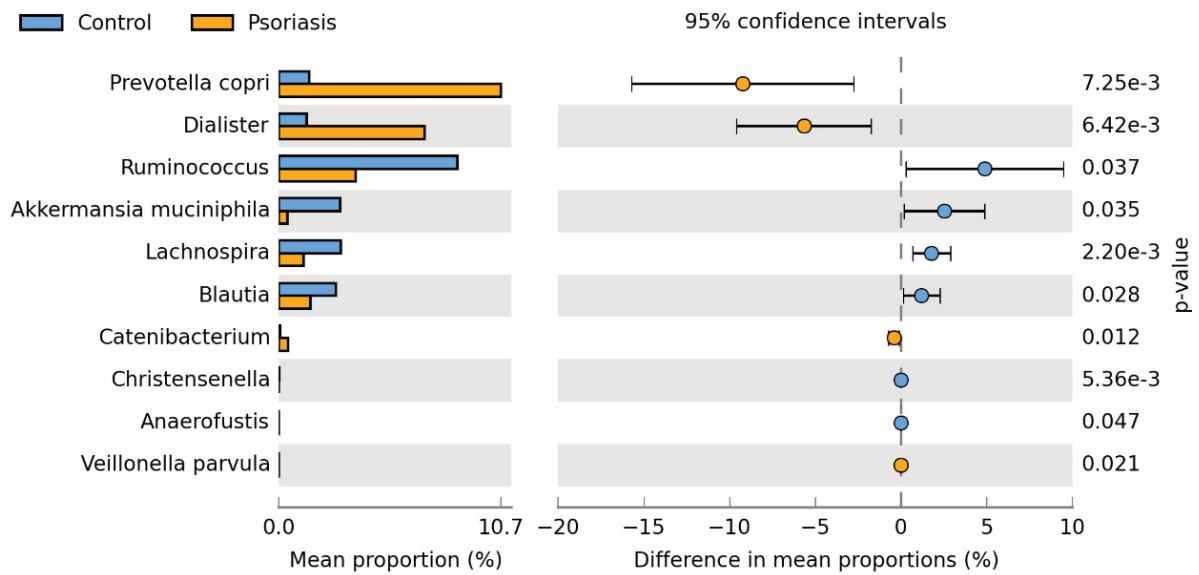


Fig. 4 – Táxons que apresentaram diferença significativa entre os grupos. São apresentados os intervalos de confiança e valores da média da abundância das relações que apresentaram diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ),  $n=21$ .

Foram realizadas análises estatísticas no grupo psoríase comparando pacientes com atividade de doença leve e com atividade de doença moderada a grave e não houve diferença significativa na microbiota intestinal. Também foi realizada comparação entre pacientes com tempo inferior ou igual a 5 anos de doença com aqueles com mais de 5 anos de doença e não houve diferença significativa na microbiota intestinal entre os grupos. Do mesmo modo não foi encontrada diferença significativa na microbiota intestinal de pacientes com início precoce da psoríase (antes dos 40 anos de idade) com os demais pacientes.

Análises das métricas de alfa biodiversidade (número de táxons observados) da microbiota dos grupos tem por objetivo identificar em qual condição há queda ou aumento significativo da quantidade de táxons. Assim, foi identificada queda significativa na riqueza bacteriana nos pacientes com psoríase quando comparados ao grupo controle (Figura 5).

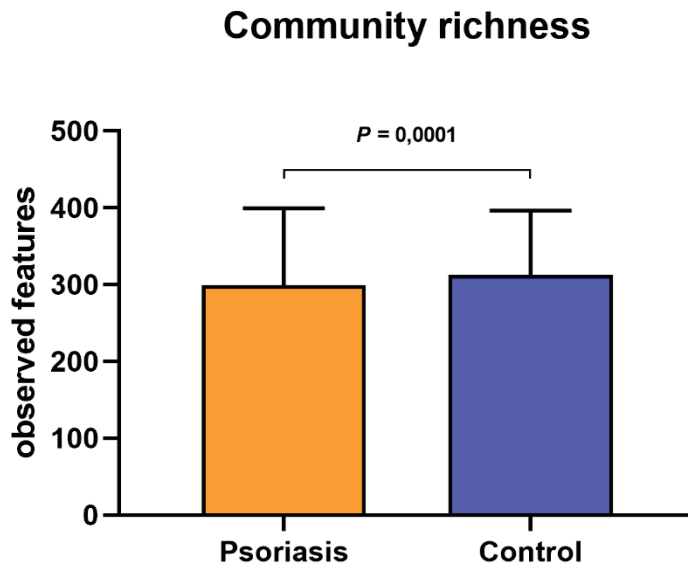


Fig. 5 – Alfa biodiversidade - número de táxons identificados nas comunidades bacterianas. São apresentados os valores da média da abundância das relações que apresentaram diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ).

Adicionalmente, análises de beta biodiversidade (PCA plot) permitem identificar agrupamento das diferentes amostras por grupo em plano de dois eixos, o que sugere que há uma marcada diferenciação das comunidades bacterianas por grupo. Nos resultados do presente estudo foi possível identificar uma leve tendência de agrupamento das amostras grupo controle (Figura 6).

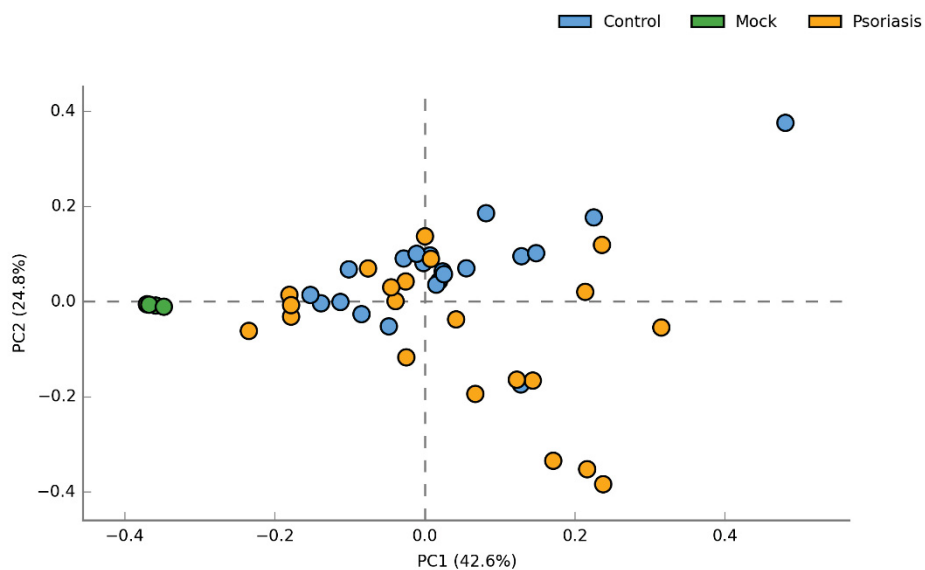


Fig. 6 – Beta biodiversidade - PCA plot representando o agrupamento das amostras por grupo. Pontos da mesma cor indicam amostras do mesmo grupo. São apresentadas as 4 amostras do grupo controle do sequenciamento “Mock”.

Análises adicionais foram realizadas no grupo psoríase quanto ao uso prévio de metotrexate comparado aos pacientes que nunca utilizaram metotrexate e não houve diferença estatística significativa na microbiota intestinal entre os grupos. Da mesma forma não houve diferença estatística na microbiota intestinal dos participantes com diagnóstico ou não de hipotireoidismo no presente estudo. Portanto, estas variáveis não interferiram nos resultados do estudo.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo atentou para um rigoroso e detalhado planejamento de critérios de exclusão e de pareamento, um diferencial de nosso estudo, para garantir a qualidade do recrutamento de pacientes e controles, pois inúmeros fatores podem influenciar a composição da microbiota intestinal (FUJIMURA et al., 2010; FLINT et al., 2012; NICHOLSON et al., 2012). Aplicados os critérios de exclusão, um total de 21 pacientes pôde ser incluído no estudo e observando o pareamento para gênero, idade, IMC, comorbidades e tabagismo, 24 controles foram incluídos.

A grande maioria dos pacientes (85,7%) apresentava psoríase em placa (vulgar), o que nos permite comparar com maior precisão com os demais estudos de microbiota em psoríase.

Uma particularidade de nosso estudo é que a quase totalidade dos pacientes apresentava a doença em atividade leve a moderada (95,2%), mesmo assim encontramos diferenças significativas na composição da microbiota comparado ao grupo controle. Na análise comparativa entre os pacientes que apresentavam atividade de doença leve (que correspondiam a 52,4% dos pacientes) e pacientes que apresentavam atividade moderada a grave (correspondente a 47,6% dos pacientes, sendo que apenas um paciente apresentava doença grave) não houve diferença significativa da microbiota intestinal entre estes grupos. Os estudos de Massalat et al. (2016), Huang et al (2019) e Yegorov et al (2020) encontraram diferenças entre a gravidade da psoríase e a composição da microbiota intestinal. Dei-Cas et al (2020) verificaram maior diversidade em pacientes com psoríase moderada a grave.

É consenso que uma menor diversidade na microbiota está correlacionada com doença e menor capacidade da comunidade bacteriana para enfrentar desafios. Identificamos no presente estudo menor diversidade bacteriana nos pacientes com psoríase quando comparados ao grupo controle ( $p$  valor = 0,0001). Dos estudos que avaliaram a microbiota intestinal de pacientes com psoríase, Hidalgo-Cantabrana et al (2019) verificaram menor diversidade nos pacientes com psoríase comparado a controles, enquanto que Codoñer et al (2018) encontraram maior diversidade em pacientes com psoríase. Scher et al (2015) encontraram menor diversidade na microbiota intestinal de pacientes com psoríase e também em pacientes com artrite psoriática.

A classificação taxonômica permite identificar diferentes níveis taxonômicos, que vão desde filo, classe, ordem, família, gênero e espécie. No presente estudo são apresentados os resultados das análises feitas a nível de gênero e espécie bacteriana. A justificativa para tal abordagem é ter um conhecimento mais preciso dos organismos que tiveram mudanças significativas na sua abundância, uma vez que uma abordagem a nível de família ou níveis taxonômicos superiores é muito abrangente e limita uma discussão mais refinada dos resultados.

Com relação aos gêneros e espécies que apresentaram diferença significativa entre os grupos psoríase e controle e considerando o intervalo de confiança de 95%, foi identificado aumento do gênero *Dialister* e *Catenilbacterium* e da espécie *Prevotella copri* nos pacientes com psoríase comparado aos controles. Também foi verificada redução dos gêneros *Ruminococcus*, *Lachnospira* e *Blautia*, assim como da espécie *Akkermansia muciniphila* no grupo psoríase, comparado ao grupo controle.

O estudo de Tito et al (2017) mostrou associação positiva entre o gênero *Dialister* e atividade de doença na espondilite anquilosante (protótipo das espondiloartrites) e a abundância de *Dialister* foi significativamente maior nos pacientes que apresentavam biópsias ileal e colônica com sinais de inflamação comparado aos pacientes que não apresentavam inflamação à biópsia e aos controles saudáveis. A mucosa intestinal de pacientes com psoríase ativa associada com artrite psoriásica, sem os sintomas intestinais, mostram lesões microscópicas mesmo quando a mucosa parecia macroscopicamente normal (SCARPA et al., 2000). Estudos futuros com biópsia intestinal são necessários para melhor elucidação da associação entre o gênero *Dialister* e psoríase.

Estudos de microbiota intestinal têm descrito uma possível participação de *Prevotella copri* na patogênese da artrite reumatoide (DRAGO, 2019). Os pacientes com psoríase mais propensos a translocação e que apresentaram maior estado inflamatório eram pertencentes ao enterotipo com predomínio do gênero *Prevotella* no estudo conduzido por Codoñer et al (2018). Chen et al. (2018) verificaram redução de *Prevotella stercorea* em pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos, criando um perfil microbiano específico do medicamento.

As espécies de *Ruminococcus* são degradadoras de mucina e muitas são importantes na manutenção da homeostase intestinal, particularmente através da

produção de SCFAs, que promovem a saúde intestinal. Porém, as espécies *Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques* são indutoras de resposta inflamatória e têm sido associadas à doença inflamatória intestinal (PNG et al., 2010; JOOSSENS et al., 2011). Scher et al (2015) também verificaram menor abundância do gênero *Ruminococcus* em pacientes com artrite psoriásica. Shapiro e colaboradores (2019) identificaram aumento de *Ruminococcus gnavus* em pacientes com psoríase comparado a controles. Como limitação técnica do método de sequenciamento do gene 16S rRNA, não foi possível a caracterização da espécie relacionada ao gênero *Ruminococcus* em nosso estudo (KNIGHT et al., 2018; COSTA; WEESE, 2019).

*Blautia* é um gênero produtor de SCFAs (ácido butírico e ácido acético) com potencial função probiótica (LIU et al., 2021). Ozato et al (2019) identificaram associação inversa entre o gênero *Blautia* e maior acúmulo de gordura visceral em adultos.

A abundância do gênero *Lachnospira*, juntamente com a espécie *Faecalibacterium prausnitzii*, foi verificada nos participantes que ingeriam maior quantidade de fibras no estudo conduzido por Lin e colaboradores (2018), sugerindo que uma maior compreensão da relação dieta-microbiota poderá impactar no desenvolvimento de estratégias de prevenção do câncer colorretal.

A espécie *Akkermansia muciniphila*, produtora de SCFAs, está associada à integridade da mucosa intestinal saudável (COLLADO et al., 2007). Redução da espécie *Akkermansia muciniphila* na microbiota intestinal de pacientes com psoríase comparado a controles foi descrita em estudos recentes (TAN et al., 2018; CHEN et al., 2018), supondo que a espécie possa ser a assinatura da microbiota intestinal da psoríase. Scher et al (2015) verificaram redução no gênero *Akkermansia* em pacientes com artrite psoriásica comparado a pacientes com psoríase e controles saudáveis. Redução de *Akkermansia muciniphila* também foi descrita nas doenças inflamatórias intestinais (PNG et al., 2010; VIGSNAES et al., 2012) e foi implicada na patogênese da obesidade (SCHNEEBERGER et al., 2015; DAO et al., 2016; CANI; DE VOS, 2017; PLOVIER et al., 2017).

Como limitação do estudo consideramos o número pequeno de participantes, mas que justificamos pela cuidadosa seleção de participantes, observando diversos

critérios de exclusão que poderiam interferir na composição da microbiota intestinal, o que é por outro lado um diferencial do nosso estudo. Outra limitação foi a não realização de um detalhado inquérito alimentar dos participantes da pesquisa, mas que foi minimizada pela exclusão de pacientes com dietas restritivas (como vegetarianos, veganos e aqueles que excluem algum componente da dieta por intolerância) e consumo de probióticos.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou diferenças significativas na composição e diversidade da microbiota intestinal de pacientes com psoríase comparado a controles. Diferenças semelhantes foram também descritas em diversos estudos que avaliaram psoríase, espondiloartrites, doenças inflamatórias intestinais e obesidade, portanto, os dados corroboram amplamente com a literatura. Destacamos especialmente a menor abundância de *Akkermansia muciniphila* no grupo psoríase, pois a abundância desta espécie reflete uma mucosa intestinal saudável e sua redução foi verificada tanto em estudos em psoríase quanto em doença intestinal inflamatória. Outro dado de grande relevância foi a identificação de uma menor diversidade bacteriana nos pacientes com psoríase comparado ao grupo controle.

Destacamos que este é o primeiro estudo brasileiro publicado, de microbiota intestinal em psoríase, que temos conhecimento, com amostras coletadas na região leste do Paraná, estado da região Sul do Brasil. Estudos em diferentes localizações geográficas e diferentes culturas são necessários considerando a potencial heterogeneidade da microbiota intestinal relacionada a estes fatores.

Os dados de nosso estudo reforçam a importância da microbiota intestinal na patogênese da psoríase. No entanto, mais estudos com um maior número de pacientes, realizados em diferentes localizações geográficas e incluindo métodos de análise funcional, são necessários para afirmar essa associação e sua importância na identificação de biomarcadores para o diagnóstico e para o manejo terapêutico individualizados dos pacientes com psoríase.

## REFERÊNCIAS

ADARSH, M.B. et al. Evaluation of subclinical gut inflammation using faecal calprotectin levels and colonic mucosal biopsy in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. **Br J Dermatol**, v. 181, n. 2, p. 401-402, 2019.

ALINAGHI, F. et al. Prevalence of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: A systematic review and meta-analysis of observational and clinical studies. **J Am Acad Dermatol**, v. 80, n. 1, p. 251-265.e19, 2019.

ARMSTRONG, A.W.; READ, C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 19, p. 1945-1960, 2020.

ARMSTRONG, E.J.; HARSKAMP, C.T.; ARMSTRONG, A.W. Psoriasis and major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 2, p. e000062, 2013.

BALATO, A. et al. Human Microbiome: Composition and Role in Inflammatory Skin Diseases. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 67, n. 1, p. 1-18, 2019.

BLAUVELT, A.; CHIRICOZZI, A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 55, n. 3, p. 379-390, 2018.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

CALDEIRA, L.F. et al. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease patients: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 15, n. 9, p. e0238910, 2020.

CALLAHAN, B.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CANI, P.D.; DE VOS, M.W. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1765, 2017.

CAMMAROTA, G. et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 569-580, 2017.

- CHENG, H. et al. The Th17/Treg Cell Balance: A Gut Microbiota-Modulated Story. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 583, 2019.
- CHEN, Y.H. et al. Lactobacillus pentosus GMNL-77 inhibits skin lesions in imiquimod-induced psoriasis-like mice. **J. Food Drug Anal**, v. 25, n. 3, p. 559–566, 2017.
- CHEN, Y.J. et al. Intestinal microbiota profiling and predicted metabolic dysregulation in psoriasis patients. **Exp Dermatol**, v. 27, n. 12, p. 1336-1343, 2018.
- CHIMENTI, M.S. et al. Interaction between microbiome and host genetics in psoriatic arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 17, n. 3, p. 276-283, 2018.
- CHOO, J.M.; LEONG, L.E.X.; ROGERS, G.B. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. **Sci Rep**, v. 5, p. 16350, 2015.
- CODOÑER, F.M. et al. Gut microbial composition in patients with psoriasis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3812, 2018.
- COLLADO, M.C. et al. Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 23, p. 7767-7770, 2007.
- COSTA, M.; WEESE, J.S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **Vet J**, v. 249, p. 10-15, 2019.
- DAO, M.C. et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. **Gut**, v. 65, n. 3, p. 426-36, 2016.
- DEGNAN, P.H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, v. 6, n. 1, p. 183-194, 2012.
- DEI-CAS, I. et al. Metagenomic analysis of gut microbiota in non-treated plaque psoriasis patients stratified by disease severity: development of a new Psoriasis-Microbiome Index. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 12754, 2020.
- DOHERTY, M.K. et al. Fecal Microbiota Signatures Are Associated with Response to Ustekinumab Therapy among Crohn's Disease Patients. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e02120-17, 2018.
- DOUGADOS, M.; BAETEN, D. Spondyloarthritis. **Lancet** v. 377, p. 2127-2137, 2011.

DOWLATSHAHI, E.A. et al. The prevalence and odds of depressive symptoms and clinical depression in psoriasis patients: a systematic review and meta-analysis. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 6, p. 1542-1551, 2014.

DRAGO, L. *Prevotella Copri* and Microbiota in Rheumatoid Arthritis: Fully Convincing Evidence? **J Clin Med**, v. 8, n. 11, p. 1837, 2019.

EPPINGA, H. et al. Prevalence and Phenotype of Concurrent Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 23, n. 10, p. 1783-1789, 2017.

EPPINGA, H. et al. The microbiome and psoriatic arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 16, n. 3, p. 407, 2014.

FLINT, H.J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 577-589, 2012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria; (2001). <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> (accessed January 2019).

FU, Y.; LEE, C.H.; CHI, C.C. Association of Psoriasis With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Dermatol**, v. 154, n. 12, p. 1417-1423, 2018.

FUJIMURA, K.E. et al. Role of the gut microbiota in defining human health. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 435-454, 2010.

GISONDI, P. et al. Psoriasis and the metabolic syndrome. **Clin Dermatol**, v. 36, n. 1, p. 21-28, 2018.

GOODRICH, J.K. et al. Conducting a Microbiome Study. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 250-262, 2014.

GREB, J.E. et al. Psoriasis. **Nat Rev Dis Primers**; v. 24, n. 2, p. 16082, 2016.

GROEGER, D. et al. Bifidobacterium infantis 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. **Gut Microbes**, v. 4, n. 4, p. 325-39, 2013.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Gut microbiota dysbiosis in a cohort of patients with psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 181, n. 6, p. 1287-1295, 2019.

- HUANG, L. et al. Dysbiosis of gut microbiota was closely associated with psoriasis. **Sci China Life Sci**, v. 62, n. 6, p. 807-815, 2019.
- JENSEN, P.; SKOV, L. Psoriasis and Obesity. **Dermatology**, v. 232, n. 6, p. 633-639, 2016.
- JOOSSENS, M. et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 631-637, 2011.
- KIM, W.B.; JEROME, D.; YEUNG J. Diagnosis and management of psoriasis. **Can Fam Physician**, v. 63, n. 4, p. 278-285, 2017.
- KNIGHT, R. et al. Best practices for analysing microbiomes. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 7, p. 410-422, 2018.
- KOMINE, M. et al. Recent Advances in Psoriasis Research; the Clue to Mysterious Relation to Gut Microbiome. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 7, p. 2582, 2020.
- KRAGSNAES, M.S. et al. Efficacy and safety of faecal microbiota transplantation in patients with psoriatic arthritis: protocol for a 6-month, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **BMJ Open**, v. 8, n. 4, p. e019231, 2018.
- KURD, S.K. et al. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. **Arch Dermatol**, v. 146, n. 8, p. 891-895, 2010.
- LEE, G.R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 3, p. 730, 2018.
- LEWIS, D.J. et al. Mechanisms of microbial pathogenesis and the role of the skin microbiome in psoriasis: A review. **Clin Dermatol**, v. 37, n. 2, p.160-166, 2019.
- LIN, D. et al. Association of dietary fibre intake and gut microbiota in adults. **Br J Nutr**, v. 120, n. 9, p. 1014-1022, 2018.
- LIU, X. et al. *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-21, 2021.
- LOWES, M.A. et al. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. **Trends Immunol**, v. 34, n. 4, p. 174-181, 2013.

MAGNUSSON, M.K. et al. Anti-TNF Therapy Response in Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Colonic Antimicrobial Peptide Expression and Microbiota Composition. **J Crohns Colitis**, v. 10, n. 8, p. 943-52, 2016.

MASALLAT, D.; MOEMEN, D.; STATE, A.F. Gut bacterial microbiota in psoriasis: A case control study. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 10, n. 33, p. 1337-1343, 2016.

MEHTA, N.N. et al. Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. **Eur Heart J**, v. 31, n. 8, p. 1000-1006, 2010.

MENTER, A. et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 3, guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. **J Am Acad Dermatol**, v. 60, n. 4, p. 643-659, 2019.

MENTER, A. et al. Joint AAD-NPF guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with biologics. **J Am Acad Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 1029-1072, 2019.

MENTER, A. et al. Joint American Academy of Dermatology-National Psoriasis Foundation guidelines of care for the management of psoriasis with systemic nonbiologic therapies. **J Am Acad Dermatol**, v. 82, n. 6, p. 1445-1486, 2020.

MICHALEK, I.M.; LORING, B.; JOHN, S.M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 31, n. 2, p. 205-212, 2017.

MIELANTS, H. et al. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. **J Rheumatol**, v. 22, n. 12, p. 2273-2278, 1995.

MOLL, J.M.; WRIGHT, V. Psoriatic arthritis. **Semin Arthritis Rheum**, n. 3, p; 55-78, 1973.

MYERS, B. et al. The gut microbiome in psoriasis and psoriatic arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 33, n. 6, p. 101494, 2019.

NAVARRO-LÓPEZ, V. et al. Efficacy and Safety of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains in Patients with Psoriasis: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Acta Derm Venereol**, v. 99, n. 12, p. 1078-1084, 2019.

NICHOLSON, J.K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.

NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clin J Gastroenterol**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2018.

OZATO, N. et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 28, 2019.

PALMA, S. et al. Consenso Brasileiro de Psoríase 2020: algoritmo de tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia. 3. ed. Rio de Janeiro, 2020.

PARAMARTA, J.E.; BAETEN, D. Spondyloarthritis: from unifying concepts to improved treatment. **Rheumatology (Oxford)**, v. 53, n. 9, p. 1547-1559, 2014.

PARKS, D.H. et al. SAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PITTAYANON, R. et al. Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. **Gastroenterology**, v. 158, n. 4, p. 930-946.e1, 2020.

PLOVIER, H. et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nat Med**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2017.

PNG, C.W. et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. **Am J Gastroenterol**, v. 105, n. 11, p. 2420-2428, 2010.

RACHAKONDA, T.D.; SCHUPP, C.W.; ARMSTRONG, A.W. Psoriasis prevalence among adults in the United States. **J Am Acad Dermatol**, v. 70, n. 3, p. 512-516, 2014.

RITCHLIN, C.T.; COLBERT, R.A.; GLADMAN, D.D. Psoriatic Arthritis. **N Engl J Med**, v. 376, n. 10, p. 957-970, 2017.

SALEM, I. et al. The Gut Microbiome as a Major Regulator of the Gut-Skin Axis. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1459, 2018.

SCARPA, R. et al. Microscopic inflammatory changes in colon of patients with both active psoriasis and psoriatic arthritis without bowel symptoms. **J. Rheumatol**, v. 27, p. 1241-1246, 2000.

SCHNEEBERGER, M. et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. **Sci Rep**, v. 5, p. 16643, 2015.

- SHAPIRO, J. et al. Psoriatic patients have a distinct structural and functional fecal microbiota compared with controls. **J Dermatol**, v. 46, n. 7, p. 595-603, 2019.
- SCHER, J.U. et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 1, p. 128-139, 2015.
- SIKORA, M. et al. Gut Microbiome in Psoriasis: An Updated Review. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 463, 2020.
- SIKORA, M. et al. Intestinal barrier integrity in patients with plaque psoriasis. **J Dermatol**, v. 45, n. 12, p. 1468-1470, 2018.
- SZÁNTÓ, M. et al. Targeting the gut-skin axis-Probiotics as new tools for skin disorder management? **Exp Dermatol**, v. 28, n. 11, p. 1210-1218, 2019.
- TAKESHITA, J. et al. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. **J Am Acad Dermatol**, v. 76, n. 3, p. 377-390, 2017.
- TAN, L. et al. The Akkermansia muciniphila is a gut microbiota signature in psoriasis. **Exp Dermatol**, v. 27, n. 2, p. 144-149, 2018.
- TAYLOR, W. et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 8, p. 2665-73, 2006.
- TITO, R.Y. et al. Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 69, n. 1, p. 114-121, 2017.
- VIGSNÆS, L.K. et al. Gram-negative bacteria account for main differences between faecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy controls. **Benef Microbes**, v. 3, n. 4, p. 287-297, 2012.
- VISSER, M.J.E.; KELL, D.B.; PRETORIUS, E.P. Bacterial Dysbiosis and Translocation in Psoriasis Vulgaris. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 7, 2019.
- WICKHAM, H. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. Springer International Publishing, 2012.
- YAN, D. et al. The Role of the Skin and Gut Microbiome in Psoriatic Disease. **Curr Dermatol Rep**, v. 6, n. 2, p. 94-103, 2017.
- YANG, H.; ZHENG, J. Influence of stress on the development of psoriasis. **Clin Exp Dermatol**, v. 45, n. 3, p. 284-288, 2020.

YEGOROV, S. et al. Psoriasis Is Associated With Elevated Gut IL-1 $\alpha$  and Intestinal Microbiome Alterations. **Front Immunol**, v. 11, p. 571319, 2020.

YEH, N.L. et al. Gut Microbiome in Psoriasis is Perturbed Differently During Secukinumab and Ustekinumab Therapy and Associated with Response to Treatment. **Clin Drug Investig**, v. 39, n. 12, p. 1195-1203, 2019.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. D1, p. D643-D648, 2013.

ZÁKOSTELSKÁ, Z. et al. Intestinal Microbiota Promotes Psoriasis-Like Skin Inflammation by Enhancing Th17 Response. **PLoS One**, v. 11, n. 7), p. e0159539, 2016.

ZANVIT, P. et al. Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis. **Nat Commun**, v. 6, p. 8424, 2015.

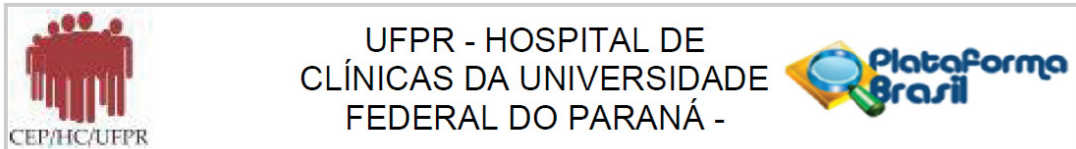
ZENG, J. et al. Critical role of environmental factors in the pathogenesis of psoriasis. **J Dermatol**, v. 44, n. 8, p. 863-872, 2017.

## APÊNDICES

<b>Apêndice 1</b> – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	58
<b>Apêndice 2</b> – Aprovação da Emenda pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	63
<b>Apêndice 3</b> – Táxons identificados nos grupos psoríase e controle .....	71
<b>Apêndice 4</b> – Táxons em comum para os grupos psoríase e controle.....	75
<b>Apêndice 5</b> – Valores exatos de métricas de abundância, desvio padrão e valores de $p$ entre os grupos psoríase e controle .....	79

## APÊNDICE 1

### APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação entre Microbiota Intestinal e Resposta ao Tratamento com Anti-TNF $\alpha$  em Pacientes com Espondiloartrites

**Pesquisador:** Valderilio Feijó Azevedo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 05942919.9.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** EDUMED EDUCACAO EM SAUDE S/S LTDA

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.319.879

##### Apresentação do Projeto:

pesquisador envia resposta às pendências apontadas pelo colegiado. Todas as pendências foram adequadamente atendidas

##### Objetivo da Pesquisa:

não se aplica

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não se aplica

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

pendências atendidas

##### Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica, o mesmo deve estar em formatação adequada e com as caixas de rubricas no rodapé das páginas que não contenham assinatura. Após, fazer cópia fiel do TCLE aprovado e rubricado em duas vias: uma ficará com o pesquisador e outra com o participante da pesquisa.

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

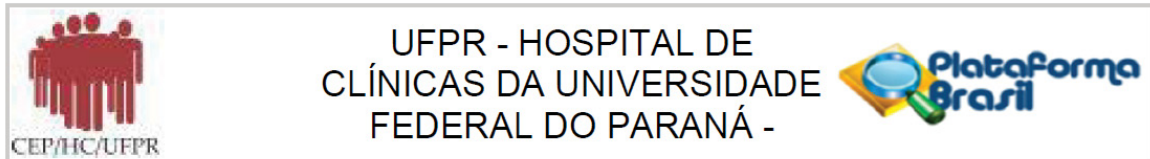
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.319.879

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto, conforme proposto, para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Os documentos da pesquisa devem ser mantidos arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1284207.pdf	05/04/2019 11:48:18		Aceito
Parecer Anterior	Relatorio_evolucao_pesquisa_2_pag_2.pdf	05/04/2019 11:45:30	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Relatorio_evolucao_pesquisa_2_pag_1.pdf	05/04/2019 11:45:02	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Termo_de_confidencialidade_2.pdf	05/04/2019 11:44:43	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Declaracao_uso_especifico_do_material_ou_dados_2.pdf	05/04/2019 11:44:07	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Coparticipante_declaracao_compromisso_com_custos_pesquisa_2.pdf	05/04/2019 11:42:57	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Coparticipante_concordancia_unidades_e_servicos_2.pdf	05/04/2019 11:42:40	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Concordancia_unidades_e_servicos_reumatologia_2.pdf	05/04/2019 11:42:20	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_encaminhamento_do_pesquisador_ao_CEP_2.pdf	05/04/2019 11:42:01	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	TCLE_espondiloartrite_2.pdf	05/04/2019 11:41:33	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	TCLE_controles_2.pdf	05/04/2019	Lilian Schade	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

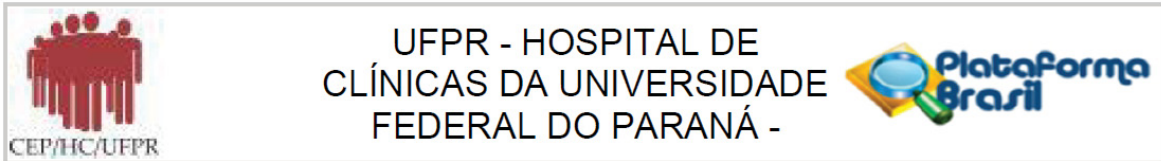
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.319.879

Parecer Anterior	TCLE_controles_2.pdf	11:41:21	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Projeto_pesquisa_2.pdf	05/04/2019 11:41:04	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Folha_de_rosto_2_pag_2.pdf	05/04/2019 11:40:41	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Folha_de_rosto_2_pag_1.pdf	05/04/2019 11:40:28	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_3.pdf	05/04/2019 11:40:11	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_2.pdf	05/04/2019 11:39:52	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_1.pdf	05/04/2019 11:39:24	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_com_a_pesqui sa_pag_2.pdf	17/01/2019 17:18:27	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_com_a_pesqui sa_pag_1.pdf	17/01/2019 17:17:44	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_guarda_de_material_biologico.p df	17/01/2019 17:15:55	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade.pdf	17/01/2019 17:14:26	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_utilizacao_de_dad os_de_arquivo.pdf	17/01/2019 17:13:07	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_uso_especifico_do_material ou_dados.pdf	17/01/2019 17:10:27	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_tornar_publicos_os_resultad os.pdf	17/01/2019 17:08:28	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_orientador_do_aluno.pdf	17/01/2019 17:06:41	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_compromisso_dos_pesquis adores.pdf	17/01/2019 17:04:39	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_ausencia_de_custos.pdf	17/01/2019 17:02:23	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_termo_responsabilidade pesquisa_pag_2.pdf	17/01/2019 16:37:55	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_termo_responsabilidade pesquisa_pag_1.pdf	17/01/2019 16:37:18	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_responsabili dade_e_supervisao.pdf	17/01/2019 16:36:23	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_compromiss o_com_custos_pesquisa.pdf	17/01/2019 16:33:49	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_ausencia_de custos.pdf	17/01/2019 16:33:20	Lilian Schade	Aceito
Outros	Coparticipante_concordancia_unidades e_servicos.pdf	17/01/2019 16:30:21	Lilian Schade	Aceito
Outros	Concordancia_unidades_e_servicos_uni clin.pdf	17/01/2019 16:29:21	Lilian Schade	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

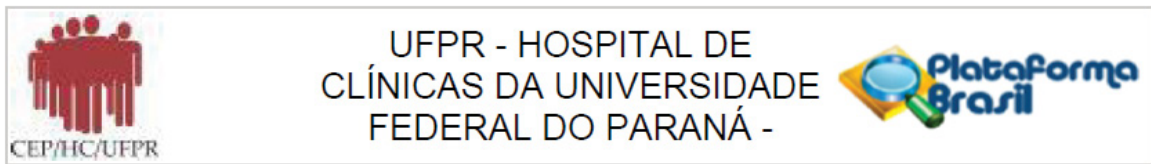
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.319.879

Outros	Concordancia_unidades_e_servicos_reu matologia.pdf	17/01/2019 16:28:42	Lilian Schade	Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_do_pesquisado r_ao_CEP.pdf	17/01/2019 16:22:39	Lilian Schade	Aceito
Outros	Relatorio_evolucao_pesquisa_pag_2.pdf	17/01/2019 16:20:03	Lilian Schade	Aceito
Outros	Relatorio_evolucao_pesquisa_pag_1.pdf	17/01/2019 16:19:22	Lilian Schade	Aceito
Outros	Coparticipante_qualificacao_pesquisado res.pdf	17/01/2019 16:10:38	Lilian Schade	Aceito
Outros	Qualificacao_dos_pesquisadores.pdf	17/01/2019 16:05:36	Lilian Schade	Aceito
Outros	Check_list_pag_2.pdf	17/01/2019 15:58:46	Lilian Schade	Aceito
Outros	Check_list_pag_1.pdf	17/01/2019 15:57:29	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_de_avaliacao_clinica.pdf	17/01/2019 15:52:55	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_de_recrutamento.pdf	17/01/2019 15:45:04	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes.pdf	17/01/2019 15:42:14	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles.pdf	17/01/2019 15:41:46	Lilian Schade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	17/01/2019 15:41:14	Lilian Schade	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	17/01/2019 15:05:05	Lilian Schade	Aceito

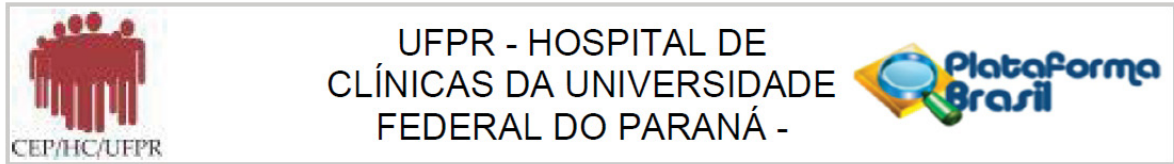
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.319.879

CURITIBA, 11 de Maio de 2019

---

**Assinado por:**  
**maria cristina sartor**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

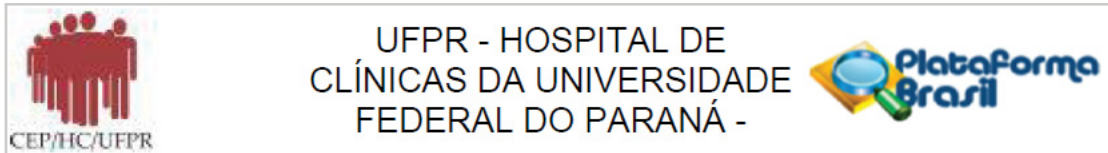
**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br

## APÊNDICE 2

### APROVAÇÃO DO EMENDA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Associação entre Microbiota Intestinal, Psoríase e Espondiloartrite

**Pesquisador:** Valderilio Feijó Azevedo

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 05942919.9.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** EDUMED EDUCACAO EM SAUDE S/S LTDA

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.616.937

##### Apresentação do Projeto:

O autor encaminha alterações ao projeto original na forma de Emenda para que tenha condições de recrutar participantes com base nesses novos critérios em tempo ainda hábil para desenvolver a pesquisa.

Foi verificado ao longo do recrutamento de participantes no Ambulatório de Espondiloartrites do HC-UFPR e no Centro de Pesquisa Edumed (este incluído conforme emenda de 04/07/2019), que o número de participantes elegíveis para o projeto continua menor do que o esperado. Como já informado na emenda anterior, a grande maioria dos pacientes do Hospital de Clínicas já faz uso de imunobiológico ou apresenta outros critérios de exclusão, por tratar-se de um hospital terciário, referência para pacientes mais complexos ou mais graves. Verificou-se durante o recrutamento na Edumed que a maioria dos pacientes, embora menos complexos, já está em uso de imunobiológicos ou não tem indicação de iniciar imunobiológico (anti-TNF) no momento, portanto, não elegíveis para o estudo.

No projeto em vigência os objetivos são avaliar a microbiota intestinal de participantes com espondiloartrites comparados com controles saudáveis e identificar modificações na microbiota intestinal após início do tratamento com anti-TNF. Os pesquisadores propõem como modificação avaliar a microbiota intestinal de pacientes com psoríase (uma doença inflamatória de pele) comparados com pacientes com espondiloartrite e com controles saudáveis. A espondiloartrite avaliada será a artrite psoriásica pois está relacionada com a psoríase, ou seja,

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



UFPR - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 3.616.937

pacientes com psoríase podem apresentar artrite psoriásica na evolução da doença. A prevalência de psoríase é maior comparado a de espondiloartrites, portanto, um maior número de pacientes poderá participar do estudo. Dentre as espondiloartrites, a artrite psoriásica é a que apresenta mais opções de tratamento não imunobiológico, portanto, há maior número de pacientes virgens de imunobiológico, além do mais, não precisarão ter indicação de início de anti-TNF, pois este não mais será o objetivo do estudo.

será necessário alterar o título para: “Associação entre Microbiota Intestinal, Psoríase e Espondiloartrite”. Opto por manter no título “espondiloartrite” e não “artrite psoriásica” para dar ênfase ao fato de as espondiloartrites em geral, pela semelhança com as doenças inflamatórias intestinais, terem motivado estudos sobre a influência da microbiota intestinal na fisiopatologia da doença, porém, na metodologia será especificado o tipo de espondiloartrite, ou seja, artrite psoriásica.

A mudança nos objetivos configura uma emenda e não um novo projeto pois será mantido como objetivo a avaliação da microbiota intestinal em espondiloartrite comparando com controles; ao invés de avaliar modificações na microbiota após anti-TNF, seá incluída a avaliação da psoríase para melhor elucidação fisiopatológica da doença como um todo (pele e articulação), o que também vem sendo sugerido recentemente pela literatura.

A metodologia no que se refere aos participantes com espondiloartrite será mantida, exceto quanto a serem pacientes com artrite psoriásica especificamente e que não será necessária coleta de nova amostra de fezes após início de anti-TNF. Serão incluídos os pacientes com psoríase na metodologia. Os controles também serão mantidos inalterados.

Os TCLEs terão modificações apenas com relação aos participantes que serão recrutados (inclusão de psoríase) e que apenas uma amostra de fezes será solicitada.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **OBJETIVO DA PESQUISA:**

Objetivo primário:

- Avaliar a microbiota intestinal de participantes com psoríase e participantes com espondiloartrite quanto à sua composição e diversidade e compará-las entre si e com controles saudáveis.

Objetivo secundário:

- Descrever a microbiota intestinal de uma amostra da população brasileira. Avaliar a reprodutibilidade dos dados de estudos prévios com os achados do presente estudo.

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

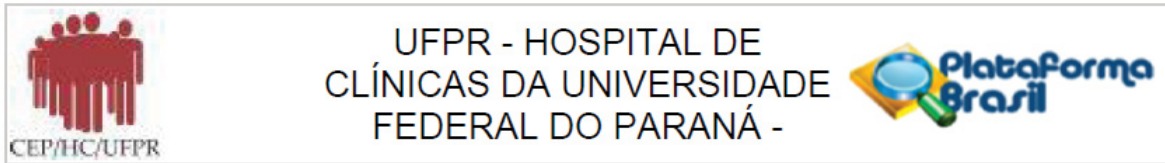
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.616.937

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Benefícios**

a) Quais os benefícios, diretos ou indiretos, para a população estudada e a sociedade? Os dados obtidos contribuirão para melhor elucidação da patogênese da psoríase e espondiloartrites.

**Riscos**

a) Quais os riscos inerentes ou decorrentes da pesquisa? Constrangimento para coleta de amostra de fezes.  
 b) Qual a possibilidade de ocorrência? Mínima.

Quais as medidas para sua minimização e proteção do participante da pesquisa? Os participantes poderão realizar a coleta das amostras de fezes no próprio domicílio e as amostras não serão identificadas pelo nome dos participantes.

**DESFECHO PRIMÁRIO:** Descrição da composição e diversidade da microbiota intestinal de participantes com psoríase e espondiloartrites comparadas a controles saudáveis.

**DESFECHO SECUNDÁRIO:** Comparação dos dados do presente estudo (com amostra de população brasileira) com os dados da literatura, quanto a sua reprodutibilidade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

a favor da alteração proposta para viabilizar o projeto em tempo hábil para publicação em revista médica, visto ser um assunto emergente, com número crescente de publicações.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

as alterações ao projeto realizadas nessa emenda estão bem pontuadas e de forma clara. Os termos de consentimento para cada população estudada estão em acordo com as normas e objetivos do projeto.

**Recomendações:**

O pesquisador deve gerar uma nova folha de rosto com a atualização do título, colher a assinatura do Diretor da Gerencia de Ensino e Pesquisa e anexar este documento na PB.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



UFPR - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 3.616.937

as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1437413_E2.pdf	26/09/2019 14:20:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_psoriase_emenda.docx	26/09/2019 14:19:41	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_espondiloartrite_emenda.docx	26/09/2019 14:19:30	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_emenda.docx	26/09/2019 14:19:19	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_recrutamento_psoriase.docx	23/09/2019 20:48:48	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_avaliacao_clinica_psoriase.docx	23/09/2019 20:48:25	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_psoriase.docx	23/09/2019 20:45:46	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_espondiloartrite.docx	23/09/2019 20:42:34	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_controles.docx	23/09/2019	Lilian Schade	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

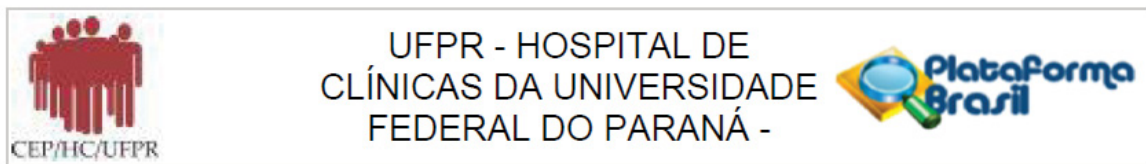
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.616.937

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles.docx	20:42:22	Lilian Schade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_Emenda.doc	23/09/2019 20:41:58	Lilian Schade	Aceito
Outros	Concordancia_unidades_e_servicos_dermatologia.pdf	23/09/2019 20:40:34	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_2.doc	23/09/2019 20:38:41	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_2_pag_4.pdf	23/09/2019 20:38:26	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_2_pag_3.pdf	23/09/2019 20:38:11	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_2_pag_2.pdf	23/09/2019 20:37:35	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_2_pag_1.pdf	23/09/2019 20:36:57	Lilian Schade	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	23/09/2019 20:35:50	Lilian Schade	Aceito
Outros	Declaracao_emenda.docx	01/08/2019 16:25:49	Lilian Schade	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA.doc	01/08/2019 16:24:13	Lilian Schade	Aceito
Outros	Declaracao_emenda.pdf	08/07/2019 20:49:12	Lilian Schade	Aceito
Outros	Carta_emenda_pag_2.pdf	08/07/2019 20:48:45	Lilian Schade	Aceito
Outros	Carta_emenda_pag_1.pdf	08/07/2019 20:48:06	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Relatorio_evolucao_pesquisa_2_pag_2.pdf	05/04/2019 11:45:30	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Relatorio_evolucao_pesquisa_2_pag_1.pdf	05/04/2019 11:45:02	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Termo_de_confidencialidade_2.pdf	05/04/2019 11:44:43	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Declaracao_uso_especifico_do_material_ou_dados_2.pdf	05/04/2019 11:44:07	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Coparticipante_declaracao_compromisso_com_custos_pesquisa_2.pdf	05/04/2019 11:42:57	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Coparticipante_concordancia_unidades_e_servicos_2.pdf	05/04/2019 11:42:40	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Concordancia_unidades_e_servicos_reumatologia_2.pdf	05/04/2019 11:42:20	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_encaminhamento_do_pesquisador_ao_CEP_2.pdf	05/04/2019 11:42:01	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	TCLE_espondiloartrite_2.pdf	05/04/2019	Lilian Schade	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

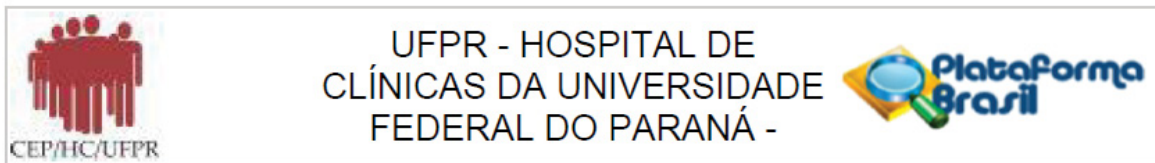
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.616.937

Parecer Anterior	TCLE_espondiloartrite_2.pdf	11:41:33	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	TCLE_controles_2.pdf	05/04/2019 11:41:21	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Projeto_pesquisa_2.pdf	05/04/2019 11:41:04	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Folha_de_rosto_2_pag_2.pdf	05/04/2019 11:40:41	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Folha_de_rosto_2_pag_1.pdf	05/04/2019 11:40:28	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_3.pdf	05/04/2019 11:40:11	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_2.pdf	05/04/2019 11:39:52	Lilian Schade	Aceito
Parecer Anterior	Carta_resposta_ao_parecer_do_CEP_p ag_1.pdf	05/04/2019 11:39:24	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_com_a_pesqui sa_pag_2.pdf	17/01/2019 17:18:27	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_com_a_pesqui sa_pag_1.pdf	17/01/2019 17:17:44	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_guarda_de_material_biologico.p df	17/01/2019 17:15:55	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade.pdf	17/01/2019 17:14:26	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_utilizacao_de_dad os_de_arquivo.pdf	17/01/2019 17:13:07	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_uso_especifico_do_material ou_dados.pdf	17/01/2019 17:10:27	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_tornar_publicos_os_resultad os.pdf	17/01/2019 17:08:28	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_orientador_do_aluno.pdf	17/01/2019 17:06:41	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_compromisso_dos_pesquis adores.pdf	17/01/2019 17:04:39	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_ausencia_de_custos.pdf	17/01/2019 17:02:23	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_termo_responsabilidade pesquisa_pag_2.pdf	17/01/2019 16:37:55	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_termo_responsabilidade pesquisa_pag_1.pdf	17/01/2019 16:37:18	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_responsabili dade_e_supervisao.pdf	17/01/2019 16:36:23	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_compromiss o_com_custos_pesquisa.pdf	17/01/2019 16:33:49	Lilian Schade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Coparticipante_declaracao_ausencia_de custos.pdf	17/01/2019 16:33:20	Lilian Schade	Aceito
Outros	Coparticipante_concordancia_unidades_ e_servicos.pdf	17/01/2019 16:30:21	Lilian Schade	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

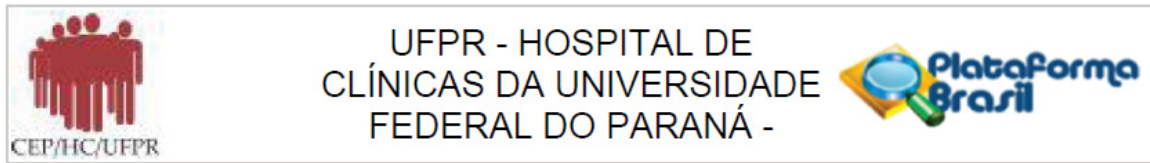
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.616.937

Outros	Concordancia_unidades_e_servicos_uni clin.pdf	17/01/2019 16:29:21	Lilian Schade	Aceito
Outros	Concordancia_unidades_e_servicos_reu matologia.pdf	17/01/2019 16:28:42	Lilian Schade	Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_do_pesquisado r_ao_CEP.pdf	17/01/2019 16:22:39	Lilian Schade	Aceito
Outros	Relatorio_evolucao_pesquisa_pag_2.pdf	17/01/2019 16:20:03	Lilian Schade	Aceito
Outros	Relatorio_evolucao_pesquisa_pag_1.pdf	17/01/2019 16:19:22	Lilian Schade	Aceito
Outros	Coparticipante_qualificacao_pesquisado res.pdf	17/01/2019 16:10:38	Lilian Schade	Aceito
Outros	Qualificacao_dos_pesquisadores.pdf	17/01/2019 16:05:36	Lilian Schade	Aceito
Outros	Check_list_pag_2.pdf	17/01/2019 15:58:46	Lilian Schade	Aceito
Outros	Check_list_pag_1.pdf	17/01/2019 15:57:29	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_de_avaliacao_clinica.pdf	17/01/2019 15:52:55	Lilian Schade	Aceito
Outros	Ficha_de_recrutamento.pdf	17/01/2019 15:45:04	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes.pdf	17/01/2019 15:42:14	Lilian Schade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles.pdf	17/01/2019 15:41:46	Lilian Schade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	17/01/2019 15:41:14	Lilian Schade	Aceito

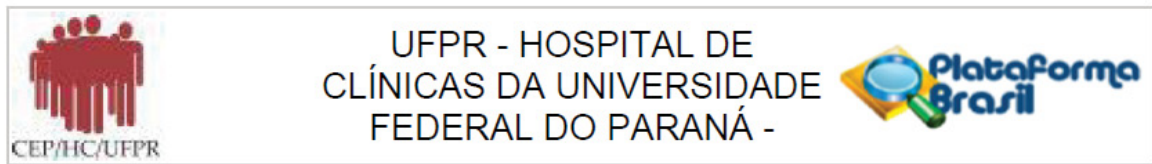
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.616.937

CURITIBA, 02 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**  
**maria cristina sartor**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

### APÊNDICE 3

#### TÁXONS IDENTIFICADOS NOS GRUPOS PSORÍASE E CONTROLE

Taxa	Control		Psoriasis		p-values
	Mean	SD	Mean	SD	
Acidaminococcus	0,11	0,29	0,710	1,61	0,118
Actinobacillus	0,00	0,00	0,001	0,00	0,182
Actinobacillus parahaemolyticus	0,00	0,00	0,003	0,01	0,085
Actinomyces	0,03	0,05	0,048	0,05	0,371
Adlercreutzia	0,01	0,02	0,013	0,03	0,832
Aggregatibacter	0,00	0,00	0,002	0,01	0,329
Akkermansia muciniphila	2,95	4,97	0,404	0,79	0,035
Alistipes indistinctus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,998
Anaerobacillus	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Anaerobiospirillum	0,00	0,01	0,000	0,00	0,329
Anaerococcus	0,01	0,01	0,000	0,00	0,077
Anaerofilum	0,00	0,00	0,001	0,00	0,926
Anaerofustis	0,00	0,00	0,000	0,00	0,047
Anaerostipes	0,14	0,52	0,149	0,59	0,978
Anaerotruncus	0,03	0,05	0,016	0,03	0,353
Anaerovibrio	0,00	0,00	0,017	0,08	0,325
Anaerovorax	0,00	0,00	0,001	0,00	0,865
Arcanobacterium	0,04	0,16	0,001	0,00	0,329
Atopobium	0,00	0,00	0,009	0,01	0,222
Bacillus	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Bacteroides	18,62	14,41	11,558	9,68	0,077
Bacteroides acidifaciens	0,00	0,00	0,001	0,00	0,185
Bacteroides barnesiae	0,01	0,04	0,000	0,00	0,295
Bacteroides caccae	0,96	2,83	0,390	0,49	0,383
Bacteroides coprophilus	0,08	0,25	0,140	0,47	0,614
Bacteroides eggerthii	0,72	1,69	0,111	0,25	0,129
Bacteroides fragilis	0,44	0,84	0,130	0,40	0,150
Bacteroides ovatus	0,31	0,49	0,425	0,61	0,526
Bacteroides plebeius	0,99	2,80	0,984	2,59	0,990
Bifidobacterium	0,15	0,35	0,039	0,05	0,168
Bifidobacterium adolescentis	0,29	1,03	0,293	0,42	0,997
Bifidobacterium longum	0,20	0,40	0,100	0,17	0,289
Bifidobacterium pseudolongum	0,00	0,00	0,002	0,01	0,176
Bilophila	0,28	0,37	0,354	0,42	0,575
Blautia	2,74	2,08	1,520	1,13	0,028
Blautia obeum	0,01	0,03	0,004	0,00	0,270
Blautia producta	0,02	0,04	0,003	0,01	0,157
Brachyspira	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329

Bulleidia	0,00	0,00	0,003	0,00	0,710
Bulleidia p-1630-c5	0,00	0,00	0,016	0,04	0,113
Butyricimonas	0,12	0,10	0,162	0,15	0,312
Butyrivibrio	0,00	0,00	0,011	0,05	0,338
Campylobacter	0,00	0,01	0,002	0,00	0,635
Candidatus Koribacter	0,00	0,00	0,000	0,00	0,971
Candidatus Solibacter	0,00	0,00	0,001	0,00	0,159
Cardiobacterium	0,00	0,00	0,000	0,00	0,990
Carnobacterium	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Catenibacterium	0,04	0,15	0,444	0,65	0,012
Cellulomonas	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329
Cetobacterium somerae	0,00	0,00	0,006	0,03	0,329
Christensenella	0,01	0,01	0,002	0,00	0,005
Citrobacter	0,00	0,00	0,001	0,00	0,121
Clostridium	0,15	0,10	0,233	0,16	0,058
Clostridium perfringens	0,00	0,00	0,003	0,01	0,361
Collinsella	0,01	0,03	0,013	0,02	0,902
Collinsella aerofaciens	0,33	0,34	0,946	1,84	0,153
Collinsella stercoris	0,00	0,00	0,001	0,00	0,432
Comamonas	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Coprobacillus	0,04	0,16	0,014	0,03	0,467
Coprococcus	1,02	0,82	0,884	0,57	0,552
Coprococcus eutactus	0,49	1,03	0,186	0,30	0,208
Corynebacterium	0,00	0,00	0,001	0,00	0,129
Dehalobacterium	0,02	0,03	0,013	0,02	0,547
Delftia	0,00	0,00	0,001	0,00	0,351
Desulfovibrio	0,58	1,17	0,440	0,47	0,623
Desulfovibrio D168	0,00	0,00	0,006	0,01	0,090
Dialister	1,35	3,36	7,003	7,88	0,006
Dorea	1,04	1,02	0,760	0,36	0,263
Dorea formicigenerans	0,01	0,01	0,016	0,02	0,536
Eggerthella lenta	0,01	0,03	0,003	0,00	0,128
Enterococcus	0,00	0,00	0,002	0,01	0,301
Epulopiscium	0,00	0,00	0,002	0,01	0,429
Erwinia	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329
Escherichia coli	0,00	0,00	0,005	0,02	0,332
Eubacterium	0,01	0,03	0,012	0,04	0,969
Eubacterium bifforme	0,46	1,11	1,037	1,96	0,262
Eubacterium cylindroides	0,00	0,01	0,009	0,04	0,429
Eubacterium dolichum	0,01	0,02	0,002	0,00	0,295
Faecalibacterium prausnitzii	8,51	5,13	7,144	5,67	0,431
Fusobacterium	0,30	1,13	0,244	0,82	0,865
Gemella	0,00	0,00	0,000	0,00	0,372
Granulicatella	0,01	0,01	0,015	0,04	0,392
Haemophilus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,777
Haemophilus parainfluenzae	0,02	0,03	0,256	0,73	0,158

Helicobacter	0,00	0,00	0,033	0,14	0,320
Holdemania	0,03	0,02	0,020	0,02	0,235
Kaistobacter	0,00	0,00	0,001	0,00	0,700
Klebsiella	0,00	0,01	0,027	0,08	0,251
Lachnobacterium	0,34	0,76	0,367	0,53	0,883
Lachnospira	2,98	2,20	1,185	0,88	0,002
Lactobacillus	0,00	0,00	0,017	0,04	0,144
Lactobacillus iners	0,00	0,01	0,000	0,00	0,297
Lactobacillus reuteri	0,00	0,00	0,002	0,01	0,278
Lactobacillus ruminis	0,00	0,02	0,015	0,03	0,174
Lactococcus	0,00	0,00	0,001	0,00	0,431
Leptotrichia	0,00	0,00	0,001	0,00	0,329
Leuconostoc	0,00	0,00	0,000	0,00	0,732
Listeria	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Megamonas	0,55	2,43	0,292	1,23	0,671
Megasphaera	0,20	0,48	1,608	3,78	0,114
Methanobrevibacter	0,01	0,02	0,005	0,01	0,329
Mitsuokella	0,02	0,06	0,415	1,34	0,198
Mitsuokella multacida	0,01	0,02	0,012	0,04	0,509
Mobiluncus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,987
Moryella	0,00	0,00	0,001	0,00	0,597
Odoribacter	0,26	0,71	0,153	0,13	0,498
Oribacterium	0,00	0,00	0,003	0,01	0,183
Oscillospira	1,57	1,06	1,686	1,64	0,798
Oxalobacter formigenes	0,01	0,01	0,005	0,01	0,212
Paludibacter	0,00	0,00	0,001	0,00	0,167
Parabacteroides	0,51	0,51	0,787	0,89	0,244
Parabacteroides distasonis	0,20	0,22	0,174	0,17	0,683
Parabacteroides gordonii	0,00	0,00	0,001	0,00	0,168
Paraprevotella	0,27	0,38	0,198	0,33	0,514
Parvimonas	0,01	0,02	0,002	0,00	0,366
Peptococcus	0,02	0,03	0,002	0,00	0,071
Peptoniphilus	0,01	0,02	0,001	0,00	0,123
Phascolarctobacterium	1,49	1,50	0,873	0,95	0,129
Porphyromonas	0,00	0,01	0,001	0,00	0,230
Prevotella	1,21	2,71	1,762	2,87	0,537
Prevotella copri	1,46	3,75	10,678	13,49	0,007
Prevotella stercorea	0,54	1,63	1,811	4,45	0,243
Proteus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329
Pseudobutyrvibrio	0,00	0,00	0,000	0,00	0,545
Pseudomonas	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329
Rhodoplanes	0,00	0,00	0,001	0,00	0,751
Roseburia	0,21	0,25	0,139	0,11	0,257
Roseburia faecis	0,01	0,01	0,002	0,00	0,053
Rothia dentocariosa	0,00	0,00	0,001	0,00	0,163
Rothia mucilaginosa	0,00	0,01	0,013	0,02	0,077

Ruminococcus	8,60	9,53	3,700	2,80	0,037
Ruminococcus bromii	0,02	0,03	0,010	0,02	0,154
Ruminococcus flavefaciens	0,09	0,29	0,046	0,13	0,582
Ruminococcus gnavus	0,15	0,48	0,080	0,15	0,555
Ruminococcus torques	0,01	0,02	0,003	0,01	0,496
Salinicoccus	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Salmonella	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Sarcina	0,00	0,01	0,000	0,00	0,329
Selenomonas	0,00	0,00	0,000	0,00	0,163
Shuttleworthia	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Slackia	0,26	0,42	0,171	0,20	0,404
Sneathia	0,00	0,02	0,000	0,00	0,345
Sphingomonas	0,00	0,00	0,000	0,00	0,990
Staphylococcus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,162
Staphylococcus aureus	0,00	0,00	0,000	0,00	0,329
Staphylococcus equorum	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Streptococcus	0,42	0,41	2,698	6,41	0,128
Streptococcus anginosus	0,00	0,00	0,018	0,05	0,168
Succinivibrio	0,30	1,12	0,164	0,60	0,647
Sutterella	1,14	1,23	1,021	1,00	0,739
Trabulsiella	0,00	0,00	0,000	0,00	1,000
Treponema	0,00	0,00	0,082	0,35	0,307
Turicibacter	0,01	0,02	0,011	0,02	0,680
Unclassified	33,30	9,78	31,983	14,63	0,740
vadinCA11	0,00	0,01	0,000	0,00	0,278
Veillonella	0,00	0,00	0,001	0,00	0,107
Veillonella dispar	0,03	0,04	0,359	0,83	0,089
Veillonella parvula	0,00	0,00	0,001	0,00	0,021

## APÊNDICE 4

### TÁXONS EM COMUM PARA AOS GRUPOS PSORÍASE E CONTROLE

Names	Total	Taxa
Core	120	Slackia
		Streptococcus
		Bacteroides barnesiae
		Oribacterium
		Haemophilus parainfluenzae
		Oxalobacter formigenes
		Peptococcus
		Dorea
		Pseudobutyrvibrio
		Lachnobacterium
		Arcanobacterium
		Ruminococcus torques
		Blautia producta
		Ruminococcus bromii
		Ruminococcus gnavus
		Candidatus Koribacter
		Bacteroides coprophilus
		Bacteroides ovatus
		Bacteroides acidifaciens
		Moryella
		Kaistobacter
		Methanobrevibacter
		Ruminococcus flavefaciens
		Parabacteroides distasonis
		Alistipes indistinctus
		Epulopiscium
		Rhodoplanes
		Enterococcus
		Delftia
		Sneathia
		Dorea formicigenerans
		Leuconostoc
		Anaerostipes
		Clostridium
		Faecalibacterium prausnitzii
		Candidatus Solibacter
		Dehalobacterium
		Eggerthella lenta
		Christensenella

Akkermansia muciniphila  
Streptococcus anginosus  
Dialister  
Bulleidia  
Eubacterium cylindroides  
Roseburia faecis  
Megamonas  
Lactobacillus ruminis  
Sutterella  
Coprococcus  
Haemophilus  
Mitsuokella multacida  
Fusobacterium  
Bacteroides eggerthii  
Helicobacter  
Butyrivibrio  
Bacteroides caccae  
Eubacterium  
Collinsella  
Blautia  
Bacteroides plebeius  
Bifidobacterium  
Anaerococcus  
Prevotella copri  
Coprobacillus  
Cardiobacterium  
Phascolarctobacterium  
Sphingomonas  
Veillonella  
Escherichia coli  
Rothia mucilaginosa  
Bifidobacterium pseudolongum  
Gemella  
Oscillospira  
Actinomyces  
Turcibacter  
Rothia dentocariosa  
Coprococcus eutactus  
Roseburia  
Granulicatella  
Parvimonas  
Bilophila  
Veillonella dispar  
Holdemania  
Megasphaera  
Acidaminococcus

		Collinsella aerofaciens
		Peptoniphilus
		Blautia obeum
		Odoribacter
		Catenibacterium
		Campylobacter
		Collinsella stercoris
		Anaerovorax
		Parabacteroides gordonii
		Prevotella
		Bacteroides
		Bacteroides fragilis
		Parabacteroides
		Anaerofilum
		Anaerotruncus
		Paraprevotella
		Succinivibrio
		Ruminococcus
		Eubacterium bifforme
		Lactococcus
		Mobiluncus
		Bifidobacterium adolescentis
		Adlercreutzia
		Mitsuokella
		Butyricimonas
		Atopobium
		Lachnospira
		Clostridium perfringens
		Klebsiella
		Porphyromonas
		Bifidobacterium longum
		Prevotella stercorea
		Lactobacillus
		Eubacterium dolichum
		Desulfovibrio
<b>Control</b>	<b>9</b>	Pseudomonas
		Erwinia
		Sarcina
		Lactobacillus iners
		Anaerobiospirillum
		vadinCA11
		Anaerofustis
		Brachyspira
		Cellulomonas
<b>Psoriasis</b>	<b>18</b>	Desulfovibrio D168
		Selenomonas

Veillonella parvula  
Corynebacterium  
Staphylococcus  
Aggregatibacter  
Treponema  
Anaerovibrio  
Bulleidia p-1630-c5  
Citrobacter  
Proteus  
Paludibacter  
Staphylococcus aureus  
Actinobacillus parahaemolyticus  
Lactobacillus reuteri  
Leptotrichia  
Actinobacillus  
Cetobacterium somerae

## APÊNDICE 5

### VALORES EXATOS DE MÉTRICAS DE ABUNDÂNCIA, DESVIO PADRÃO E VALORES DE $p$ ENTRE OS GRUPOS PSORÍASE E CONTROLE

Taxa	Control		Psoriasis		p-values
	Mean	SD	Mean	SD	
Lachnospira	2,98	2,20	1,18	0,88	0,002
Christensenella	0,01	0,01	0,00	0,00	0,005
Dialister	1,35	3,36	7,00	7,88	0,006
Prevotella copri	1,46	3,75	10,68	13,49	0,007
Catenibacterium	0,04	0,15	0,44	0,65	0,012
Veillonella parvula	0,00	0,00	0,00	0,00	0,021
Blautia	2,74	2,08	1,52	1,13	0,028
Akkermansia muciniphila	2,95	4,97	0,40	0,79	0,035
Ruminococcus	8,60	9,53	3,70	2,80	0,037
Anaerofustis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,047